

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001年4月5日 (05.04.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/23591 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/63, (74) 代理人: 中村 稔, 外(NAKAMURA, Minoru et al.);
C12P 21/02, C12N 9/10, 9/48 〒100-8355 東京都千代田区丸の内3丁目3番1号 新東京ビル646号 Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/06780
- (22) 国際出願日: 2000年9月29日 (29.09.2000)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願平11/280098 1999年9月30日 (30.09.1999) JP
特願2000/194043 2000年6月28日 (28.06.2000) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 味の素株式会社 (AJINOMOTO CO., INC.) [JP/JP]; 〒104-0031 東京都中央区京橋1丁目15番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 菊池慶実 (KIKUCHI, Yoshimi) [JP/JP]. 伊達雅代 (DATE, Masayo) [JP/JP]. 梅澤有希子 (UMEZAWA, Yukiko) [JP/JP]. 横山敬一 (YOKOYAMA, Keiichi) [JP/JP]. 松井裕 (MATSUI, Hiroshi) [JP/JP]; 〒210-0801 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社 中央研究所 内 Kanagawa (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING TRANSGLUTAMINASE

WO 01/23591 A1

(54) 発明の名称: トランスグルタミナーゼの製造法

(57) Abstract: A process for the secretory production of a foreign protein (in particular, transglutaminase) by using a coryneform bacterium. Namely, a process for producing a foreign protein (in particular, transglutaminase) which comprises making a coryneform bacterium to produce an industrially useful foreign protein (in particular, transglutaminase) and efficiently releasing the product outside the cells (i.e., secretory production). A target foreign protein (in particular, transglutaminase) is produced by using an expression construct wherein the target foreign protein gene sequence containing the pro-structure part (in particular, pro-transglutaminase gene sequence) is ligated to the downstream of a sequence encoding the signal peptide domain originating in a coryneform bacterium, transferring this expression type gene construct into the coryneform bacterium, culturing the thus transformed coryneform bacterium, and treating the protein which is released outside the cells with a protease, etc. to thereby cleave and eliminate the pro-part.

/続葉有/



(57) 要約:

本発明は、異種タンパク質、中でもトランスグルタミナーゼをコリネ型細菌で分泌生産させる方法に関する。

本発明により、コリネ型細菌に産業上有用な異種タンパク質、特にトランスグルタミナーゼを生産させ、これを効率的に菌体外に放出（分泌生産）させることによって、異種タンパク質、特にトランスグルタミナーゼを製造する方法が提供される。

コリネ型細菌由来のシグナルペプチド領域をコードする配列の下流にプロ構造部を含む目的異種タンパク質遺伝子配列、特にプロトランスグルタミナーゼ遺伝子配列を結合した発現構築物を使用し、この発現型遺伝子構築物をコリネ型細菌に導入し、形質転換コリネ型細菌を培養し、菌体外に放出されたタンパク質をプロテアーゼ等で処理してプロ部分を切断除去することによって、目的異種タンパク質、特にトランスグルタミナーゼを製造する。

明細書

トランスグルタミナーゼの製造法

発明の背景

本発明は、異種タンパク質、中でもトランスグルタミナーゼをコリネ型細菌で分泌生産する方法に関するものである。該方法で分泌生産される異種タンパク質は産業上有用な酵素や生理活性タンパク質等であり、トランスグルタミナーゼは食品加工や医薬等に幅広く利用されている。

異種タンパク質の分泌生産としてはこれまでにバチルス属細菌による分泌生産の総説[Microbiol. rev., 57, 109-137(1993)]、メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* による分泌生産の総説[Biotechnol., 11, 905-910(1993)]、そして *Aspergillus* 属のカビによる工業的生産の報告[Biotechnol., 6, 1419-1422(1988); Biotechnol., 9, 976-981(1991)]等のように多数報告されている。

本発明の1つの実施態様において分泌生産されるトランスグルタミナーゼはタンパク質のペプチド鎖内にある γ -カルボキシアミド基のアシル転移反応を触媒する酵素である。本酵素をタンパク質に作用させると、 ϵ -(γ -Glu)-Lys 架橋形成反応、Gln の脱アミド化によるGlu への置換反応が起こりうる。このトランスグルタミナーゼは、ゼリー等のゲル化食品、ヨーグルト、チーズ、あるいはゲル状化粧品などの製造や食肉の肉質改善等に利用されている（特公平1-50382）。また、熱に安定なマイクロカプセルの素材、固定化酵素の担体などの製造に利用されているなど、産業上利用性の高い酵素である。

トランスグルタミナーゼはこれまでに動物由来のものと微生物由来のもの（マイクロバイアルトランスグルタミナーゼ：以下「MTG」という）が知られている。前者は、カルシウムイオン依存性の酵素で、動物の臓器、皮膚、血液などに分布している。例えば、モルモット肝臓トランスグルタミナーゼ（K. Ikura et

al. Biochemistry 27, 2898(1988))、ヒト表皮ケラチン細胞トランスグルタミナーゼ (M. A. Phillips et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 9333(1990))、ヒト血液凝固因子XIII (A. Ichinose et al. Biochemistry 25, 6900(1990)) などがある。

後者については、ストレプトバーチシリウム属 (*Streptoverticillium*) の菌から、カルシウム非依存性のものが発見されている。例えば、ストレプトバーチシリウム・グリセオカルニウム (*Streptoverticillium griseocarneum*) IFO 12776、ストレプトバーチシリウム・シナモニウム (*Streptoverticillium cinnamoneum* sub sp. *cinnamoneum*) (以後 *S. cinnamoneum* と略すことがある) IFO 12852、ストレプトバーチシリウム・モバラエンス (*Streptoverticillium mobaraense*) (以後、*S. mobaraense* と略すことがある) IFO 13819 等があげられている (特開昭64-27471)。これらの微生物が生産するトランスグルタミナーゼの一次構造はペプチドマッピング及び遺伝子構造解析の結果、動物由来のものとは相同性を全く持たないことが判明している (ヨーロッパ特許公開公報0 481 504 A1)。

微生物由来トランスグルタミナーゼ (MTG) は、上記菌類等の培養物から精製操作をへて製造されているため、供給量、効率等の点で問題があった。また、遺伝子工学的手法によるトランスグルタミナーゼの製造も試みられている。トランスグルタミナーゼタンパク質およびその遺伝子については例えば、Biosci. Biotechnol. Biochem., 58, 82-87(1994), Biosci. Biotechnol. Biochem., 58, 88-92(1994)、Biochimie, 80, 313-319(1998)., Eur. J. Biochem., 257, 570-576 (1998), WO 96/06931、WO 96/22366などに報告されており、これらには例えば *Streptomyces lividans*、*Aspergillus oryzae*、*Escherichia coli* 等の宿主ベクター系での発現生産に関する報告がなされている。これらの情報と共に、*E. coli*、酵母等の微生物における分泌発現 (特開平5-199883) による方法と *E. coli* で MTG を不活性融合タンパク質封入体として発現させた後、この封入体をタンパク質変

性剤で可溶化し、脱変性剤処理を経て再生させることにより活性をもつMTGを生産する方法（特開平6-30771）が報告されている。しかしながら、E.coliや酵母等の微生物によるこのような分泌発現においては、その発現量が非常に少ないという問題点が指摘される。

一方、コリネ型細菌を利用して異種タンパク質を効率良く分泌生産するための研究としては、これまでにコリネバクテリウム・グルタミカム（*Corynebacterium glutamicum*）（以後、*C. glutamicum*と略すことがある）によるヌクレアーゼ（nuclease）やリパーゼの分泌[US4965197, J.Bacteriol., 174, 1854-1861(1992)]及び、サチライシン等のプロテアーゼの分泌[Appl.Environ.Microbiol., 61, 1610-1613(1995)]、コリネ型細菌の細胞表層タンパク質の分泌に関する研究[特表平6-502548]、これを利用したフィブロネクチン結合タンパク質の分泌[Appl. Environ. Microbiol., 63, 4392-4400(1997)]、変異型分泌装置を利用してタンパク質の分泌を向上させた報告[特開平11-169182]等があるが、ごく限られたタンパク質について極めて少数の報告があるのみである。タンパク質の蓄積量でみると、Appl. Environ. Microbiol., 61, 1610-1613 (1995)において、*Bacillus subtilis*由来のサチライシン遺伝子(*aprE*)のプロモーター、リボソーム結合部位及びシグナルペプチドの配列を利用して*Dichelobacter nodosus*由来のアルカリ性プロテアーゼの遺伝子を*C. glutamicum*において発現させ、約2.5mg/mlの蓄積を認めた例はあるものの、US4965197、特表平6-502548、あるいは特開平11-169182の記載においては具体的な分泌蓄積の値が記載されておらず、また、フィブロネクチン結合タンパク質の分泌[Appl. Environ. Microbiol., 63, 4392-4400(1997)]においては、最大約2.5μg/Lという非常に少量の分泌蓄積が確認されているに過ぎない。この様に、実用的なレベルで効率よく培地中に異種タンパク質を蓄積させたという報告は未だなされていない。

また、コリネ型細菌の遺伝子操作技術は、プロトプラストによるトランスフォ

ーメーション法の確立[J.Bacteriol., 159, 306-311(1984); J.Bacteriol., 161, 463-467(1985)]、各種ベクターの開発[Agric. Biol. Chem., 48, 2901-2903(1984); J.Bacteriol., 159, 306-311(1984); J.Gen. Microbiol., 130, 2237-2246(1984); Gene, 47, 301-306(1986); Appl. Microbiol. Biotechnol., 31, 65-69(1989)]、遺伝子発現制御法の開発[Bio/Technology, 6, 428-430(1988)]及びコスミドの開発[Gene, 39, 281-286(1985)]など、プラスミドやファージを用いた系で発展してきた。またコリネ型細菌由来の遺伝子クローニング[Nucleic Acids Res., 14, 10113-1011(1986); J. Bacteriol., 167, 695-702(1986); Nucleic Acids Res., 15, 10598(1987); Nucleic Acids Res., 15, 3922(1987); Nucleic Acids Res., 16, 9859(1988); Agric. Biol. Chem., 52, 525-531 (1988); Mol. Microbiol., 2, 63-72(1988); Mol. Gen. Genet., 218, 330-339(1989); Gene, 77, 237-251(1989)]についても報告されている。

さらにコリネ型細菌由来の転移因子についても報告されている[W093/18151; E P0445385; 特開平6-46867; Mol. Microbiol., 11, 739-746(1994); Mol. Microbiol., 14, 571-581(1994); Mol. Gen. Genet., 245, 397-405(1994); FEMS Microbiol. Lett., 126, 1-6(1995); 特開平7-107976]。

転移因子とは染色体上で転移し得るDNA断片で、原核生物から真核生物までの広い範囲の生物に存在する事が知られている。転移因子を利用したトランスポゾンが開発され[W093/18151; 特開平7-107976; Mol. Gen. Genet., 245, 397-405(1994); 特開平9-70291]、トランスポゾンで異種遺伝子を発現させることも可能になってきた。

発明の開示

本発明は、コリネ型細菌に産業上有用な異種タンパク質、特にトランスグルタミナーゼを生産させ、これを効率的に菌体外に分泌（分泌生産）させることに

よって、異種タンパク質、特にトランスグルタミナーゼを製造する方法を提供することを目的とする。

本発明者らは、放線菌等の分泌タンパク質においてシグナルペプチドと共にプロ部分も分泌過程に重要な機能を果たしていることに着目し、産業上有用な異種タンパク質、特にトランスグルタミナーゼを効率よく分泌生産する方法を発明するに至った。

すなわち、本発明は、コリネ型細菌由来のシグナルペプチドの下流にプロ構造部を含む異種の分泌型タンパク質が接続された融合タンパク質をコリネ型細菌に産生および分泌させ、次いでプロ構造部を切断・除去することを特徴とする、異種の分泌型タンパク質の製造方法である。

より具体的には、本発明は、コリネ型細菌由来のシグナルペプチド領域、特に細胞表層タンパク質のシグナルペプチド領域をコードする配列の下流にプロ構造部を含む目的タンパク質遺伝子配列、特にプロトランスグルタミナーゼ遺伝子配列を結合した発現構築物をコリネ型細菌に導入し、得られた形質転換コリネ型細菌を培養し、生じたタンパク質を菌体外に効率よく分泌させ、菌体外に放出されたタンパク質をプロテアーゼ等で処理してプロ構造部分を切断することによって、多量の目的異種タンパク質、特にトランスグルタミナーゼを得る方法である。

さらにまた本発明は、プロテアーゼ等についてもトランスグルタミナーゼ遺伝子構築物と同じようにこれらのプロテアーゼ等の発現型遺伝子構築物を作製し、プロトランスグルタミナーゼ遺伝子を含む発現構築物とともにコリネ型細菌に導入し、得られた形質転換コリネ型細菌を培養するか、または別のコリネ型細菌に導入し、得られた形質転換コリネ型細菌をプロトランスグルタミナーゼ遺伝子導入菌と共に培養し、プロトランスグルタミナーゼおよびこれらのプロテアーゼを分泌発現させることにより、プロトランスグルタミナーゼのプロ構造部分を切断したトランスグルタミナーゼを得る方法である。

なお、本明細書において、タンパク質またはペプチドが「分泌」されるとは、タンパク質またはペプチドの分子が細菌菌体外（細胞外）に移送されることをいい、最終的にそのタンパク質またはペプチド分子が培地中に完全に遊離状態におかれる場合はもちろん、一部のみが菌体外に存在している場合、菌体表層に存在している場合も含む。

発明を実施するための最良の形態

本発明の方法により、コリネ型細菌が宿主ベクター系として用いられ、コリネ型細菌の細胞表層タンパク質のシグナルペプチドの下流に分泌型のプロ構造部を含むトランスグルタミナーゼ遺伝子を結合した発現構築物が作製され、これがコリネ型細菌内に導入され、発現され、菌体外に分泌されたプロトランスグルタミナーゼのプロ構造部をプロテアーゼ等で処理して切断することによって、プロ構造部が除去された多量のトランスグルタミナーゼが得られる。

さらにまた本発明の方法により、プロテアーゼ等についてもプロトランスグルタミナーゼ遺伝子構築物と同じようにこれらのプロテアーゼ等の発現型遺伝子構築物を作製し、プロトランスグルタミナーゼ遺伝子構築物とともにコリネ型細菌に導入し、得られた形質転換コリネ型細菌を培養するか、または別のコリネ型細菌に導入し、得られた形質転換コリネ型細菌をプロトランスグルタミナーゼ遺伝子導入菌と共に培養、分泌発現することにより、プロトランスグルタミナーゼのプロ部分を切断したトランスグルタミナーゼを直接菌体外に得ることができる。

分泌型タンパク質は一般にはブレペプチドまたはブレプロペプチドとして翻訳され、その後、成熟型タンパク質になることが知られている。すなわち、一般に、ブレペプチドまたはブレプロペプチドとして翻訳された後、シグナルペプチド（「ブレ部分」）が切断されて成熟ペプチドまたはプロペプチドに変換され、プロペプチドはプロテアーゼによってさらにプロ部分が切断されて成熟ペプチドに

なることが知られている。本明細書において、「シグナル配列」とは、分泌性タンパク質前駆体のN末端に存在し、かつ天然の成熟タンパク質には存在しない配列をいい、「シグナルペプチド」とはそのようなタンパク質前駆体から切り取られるペプチドをいう。一般にはシグナル配列は菌体外への分泌に伴ってプロテアーゼ（一般にシグナルペプチダーゼと呼ばれる）によって切断される。このようなシグナルペプチドは生物種を越えて一定の共通した配列上の特徴を有するが、ある生物種で分泌機能を示すシグナルペプチドが他の生物種においても必ずしも分泌機能を発揮するというわけではない。

本明細書において、シグナルペプチドおよびプロ部分の両方を有するタンパク質、すなわち、一次翻訳産物を「プレプロタンパク質」と称することがあり、また、シグナルペプチドを有しないがプロ部分を有するタンパク質を「プロタンパク質」と称することがある。プロタンパク質のプロ部分は「プロ構造部」または単に「プロ構造」と称することもあり、本明細書においてタンパク質の「プロ構造部／プロ構造」とタンパク質の「プロ部分」とは互換的に使用される。プレプロタンパク質またはプレタンパク質において、そのシグナルペプチドは異なるタンパク質に由来する場合であっても、目的タンパク質に天然に存在するシグナルペプチドであってもよいが、使用する宿主の分泌型タンパク質に由来することが好ましい。あるいは、使用する宿主のコドン使用頻度に応じて最適なコドン有するように改変してもよい。さらに本発明の目的に使用し得るシグナルペプチドは、それが由来する天然の成熟タンパク質のN末端アミノ酸配列を一部含んでもよい。シグナルペプチドが異なるタンパク質に由来する場合はプレプロタンパク質を特に「異種融合プレプロタンパク質」と称することもある。例えば、タンパク質がトランスグルタミナーゼの場合は、それぞれ「プレプロトランスグルタミナーゼ」、「プロトランスグルタミナーゼ」および「異種融合プレプロトランスグルタミナーゼ」と称される。また、「プロ部分を切断した」タンパク質と

は、ペプチド結合を切断することによってプロ部分を構成する少なくとも1以上のアミノ酸を除去したタンパク質をいい、そのN末端領域が天然の成熟型タンパク質のものと完全に一致するタンパク質、および、そのタンパク質の活性を有する限り、天然のタンパク質に比較してN末端にプロ部分に由来する1以上の余分のアミノ酸を有するものおよび天然の成熟型タンパク質よりもアミノ酸配列が短いタンパク質も含まれる。

これまでコリネ型細菌を用いて異種タンパク質を菌体外に分泌生産した例は従来の技術の項に述べた如く極めて少なく、かつ技術としては未完である。さらにまたコリネ型細菌が自身で菌体外にプロテアーゼ等のタンパク質を分泌しているという例は知られておらず、内在性DNaseの分泌[US4965197]と、本発明において使用する細胞表層タンパク質[特表平6-502548]が細胞表層より剥がれ落ちて菌体外に見出されている事実が知られている例である。ただし、コリネ型細菌では分泌に関わるシグナルペプチドは細胞表層タンパク質を除いてはこれまで知られていない。これまでに知られているコリネ型細菌の細胞表層タンパク質としては、コリネバクテリウム・グルタミカム(*C. glutamicum*)の細胞表層タンパク質であるPS1及びPS2の遺伝子[特表平6-502548]、及びコリネバクテリウム・アンモニアゲネス(*Corynebacterium ammoniagenes*) (以後、*C. ammoniagenes*と略すことがある)の細胞表層タンパク質であるSlpAの遺伝子[特開平10-108675]が知られているだけである。これらのタンパク質の内、PS1とSlpAの間には若干の相同性(約30%)が認められるが、その他にはほとんど相同性は認められず、さらにシグナル配列領域に関しては互いに相同性は認められていない。シグナル配列の例として、コリネバクテリウム・グルタミカムのPS1とPS2のシグナル配列を配列番号29と1に、コリネバクテリウム・アンモニアゲネスのSlpAのシグナル配列を配列番号2に示す。

そこで、本発明者らはコリネバクテリウム・グルタミカム(*C. glutamicum*) (旧

名称ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム (*Brevibacterium lactofermentum*)) ATCC13869株よりPS2タンパク質遺伝子をクローン化し、その配列を決定したところ、シグナル配列領域には既知の*C. glutamicum*由来のものとの違いが認められなかったが、成熟型細胞表層タンパク質のN末端アミノ酸の38残基までに2つの違いが認められた(配列番号7に示すアミノ酸配列において40残基目のThrがAsn、55残基目のGlyがGlu)。そのシグナル配列30アミノ酸残基および成熟型細胞表層タンパク質のN末端アミノ酸38残基を含む68残基をコードする塩基配列及びプロモーター領域を含むその5'-上流領域を配列番号6に、アミノ酸配列を配列番号7に示した。

次に、本発明者はコリネ型細菌において異種タンパク質を多量に菌体外に分泌生産することが可能かどうかを試みるべく細胞表層タンパク質のプロモーター領域やシグナルペプチドを含む領域を利用しての異種タンパク質の分泌研究を行った。

放線菌由来のトランスグルタミナーゼ遺伝子はGCコンテンツが高いが、コリネ型細菌もそれに近く、またコドン利用性も近似しているので、放線菌の遺伝子そのものがそのまま利用しうる利点がある。そこで本発明者は放線菌由来のトランスグルタミナーゼ遺伝子をそのまま利用しうるか否かを検討した結果、放線菌由来のトランスグルタミナーゼのシグナルペプチドはコリネ型細菌では機能しないことがあきらかになった。しかしながらコリネ型細菌由来の細胞表層タンパク質のシグナルペプチドと融合した放線菌由来のプロ構造部を含む成熟タンパク質をコードするトランスグルタミナーゼ遺伝子はそのまま有効に機能し、プロ構造部を有するプロタンパク質として効率良く菌体外に分泌されることが明らかとなった。さらにまた細胞表層タンパク質のシグナルペプチド30アミノ酸残基と成熟細胞表層タンパク質のN末端部分の38アミノ酸残基を余分に含む、すなわち、成熟細胞表層タンパク質のN末端部分が融合したプロ構造部付きトランスグルタ

ミナーゼ遺伝子を使用するとプロトランスグルタミナーゼの菌体外分泌効率がさらに増大することが示された。

本発明に言うコリネ型細菌とは好気性のグラム陽性かん菌であり、従来ブレビバクテリウム属に分類されていたが現在コリネバクテリウム属に統合された細菌を含み(Int. J. Syst. Bacteriol., 41, 255(1981))、またコリネバクテリウム属と非常に近縁なブレビバクテリウム属細菌を含む。コリネ型細菌を使用することの利点としてはこれまでに異種タンパク質の分泌に好適とされるカビ、酵母やBacillus属細菌と比べ、もともと菌体外に分泌されるタンパク質が極めて少なく、異種タンパク質を分泌生産した場合の精製過程が簡略化、省略化できることであり、また糖、アンモニアや無機塩等のシンプルな培地で良く生育し、培地代や培養方法、培養生産性で優れていることである。

本発明において宿主菌として使用できるコリネ型細菌としては、L-グルタミン酸生産菌に代表されるブレビバクテリウム・サッカロリティウムATCC14066、ブレビバクテリウム・インマリオフィルムATCC14068、ブレビバクテリウム・ラクトファーマメンタム(コリネバクテリウム・グルタミカム) ATCC13869、ブレビバクテリウム・ロゼウムATCC13825、ブレビバクテリウム・フラバム(コリネバクテリウム・グルタミカム) ATCC14067、コリネバクテリウム・アセトアシドフィルムATCC13870、コリネバクテリウム・グルタミカムATCC13032、コリネバクテリウム・リリウム(コリネバクテリウム・グルタミカム) ATCC15990、ブレビバクテリウム・アンモニアゲネス(コリネバクテリウム・アンモニアゲネス) ATCC6871等の野生株、及びこれら野生株より誘導される変異株、例えばグルタミン酸生産性を失った変異株、更にはリジン等のアミノ酸生産変異株、イノシン等の核酸のような他の物質を生産する変異株も含まれる。

本発明に使用される遺伝子構築物は、一般にプロモーター、適切なシグナルペプチドをコードする配列および目的タンパク質をコードする核酸断片、およびコ

リネ型細菌中で目的タンパク質遺伝子を発現させるために必要な制御配列（オペレーターやターミネーター等）を、それらが機能し得るように適切な位置に有するものである。目的タンパク質は、N末端にプロ構造部を有していてもよい。この構築物のために使用できるベクターは特に制限されず、コリネ型細菌中で機能し得るものであればよく、プラスミドのように染色体外で自律増殖するものであっても細菌染色体に組み込まれるものであってよい。コリネ型細菌由来のプラスミドは特に好ましい。これらには、例えばpHM1519(Agric, Biol. Chem., 48, 2901-2903(1984))、pAM330 (Agric. Biol. Chem., 48, 2901-2903(1984))、およびこれらを改良した薬剤耐性遺伝子を有するプラスミドが含まれる。また、人工トランスポゾン等も利用することができる。トランスポゾンが使用される場合は相同組換えまたはそれ自身の転移能によって目的遺伝子が染色体中に導入される。

本発明に使用できるプロモーターは特に限定されず、コリネ型細菌の菌体内で機能し得るプロモーターであれば一般に使用でき、更に異種由来の、例えばtacプロモーター等のE.coli由来のプロモーターであってもよい。その中で、tacプロモーター等の強力なプロモーターがより好ましい。コリネ型細菌由来のプロモーターとしては、例えば、細胞表層タンパク質のPS1、PS2、SlpAの遺伝子のプロモーター、各種アミノ酸生合成系、例えばグルタミン酸生合成系のグルタミン酸脱水素酵素遺伝子、グルタミン合成系のグルタミン合成酵素遺伝子、リジン生合成系のアスパルトキナーゼ遺伝子、スレオニン生合成系のホモセリン脱水素酵素遺伝子、イソロイシンおよびバリン生合成系のアセトヒドロキシ酸合成酵素遺伝子、ロイシン生合成系の2-イソプロピルリンゴ酸合成酵素遺伝子、プロリンおよびアルギニン生合成系のグルタミン酸キナーゼ遺伝子、ヒスチジン生合成系のホスホリボシル-ATPピロホスホリラーゼ遺伝子、トリプトファン、チロシンおよびフェニルアラニン等の芳香族アミノ酸生合成系のデオキシアラビノヘプツロン酸リン酸（DAHP）合成酵素遺伝子、イノシン酸およびグアニル酸のような核酸生合成系

におけるホスホリボシルピロホスフェート(PRPP)アミドトランスフェラーゼ遺伝子、イノシン酸脱水素酵素遺伝子およびグアニル酸合成酵素遺伝子のプロモーターが挙げられる。

本発明で使用するシグナルペプチドは、宿主であるコリネ型細菌の分泌性タンパク質のシグナルペプチドであり、好ましくは、コリネ型細菌の細胞表層タンパク質のシグナルペプチドである。コリネ型細菌の細胞表層タンパク質としては、*C. glutamicum*に由来するPS1及びPS2（特表平6-502548）、及び*C. ammoniagenes*に由来するSlpA（特開平10-108675）が挙げられる。PS1のアミノ酸配列を配列番号29に、PS2のアミノ酸配列を配列番号1に、SlpAのアミノ酸配列を配列番号2に示す。また、米国特許4965197によれば、コリネ型細菌由来のD Naseにもシグナルペプチドがあると言われており、そのようなシグナルペプチドも本発明に利用することができる。

シグナルペプチドには、それが由来する分泌性タンパク質のN末端アミノ酸配列の一部が付加されていてもよい。シグナル配列は、翻訳産物が菌体外に分泌される際にシグナルペプチダーゼによって切断される。なお、シグナルペプチドをコードする遺伝子は、天然型のままでも使用できるが、使用する宿主のコドン使用頻度に応じて最適なコドンを行するように改変してもよい。

これらのシグナルペプチドを使用する場合、目的とするタンパク質をコードする遺伝子は、シグナルペプチドをコードする遺伝子の3'-末端側に接続し、かつ、上記プロモーターにより発現の制御を受けるように配置する。

本発明によって分泌生産し得る有用タンパク質は、本質的には動植物や微生物由来の分泌型タンパク質全般が含まれ特に限定されない。例えば、プロテアーゼ、アミノペプチダーゼ、カルボキシペプチダーゼ、コラゲナーゼおよびキチナーゼ等のタンパク質を本発明によって分泌生産することができる。本発明によって分泌生産されるタンパク質は天然で分泌型であるタンパク質が好ましく、より好ま

しくはプロ構造部が付加したタンパク質が好ましく、トランスグルタミナーゼは本発明によって分泌生産される有用タンパク質として特に好ましい。トランスグルタミナーゼ遺伝子としては放線菌、例えば*S. mobaraense* IF0 13819、*S. cinnamoneum* IF0 12852、*Streptoverticillium griseocarneum* IF0 12776、*Streptomyces lydicus*[W09606931]等やOomycetes[W09622366]等のカビなどの分泌型のトランスグルタミナーゼの遺伝子が本発明の目的に利用可能である。これらのタンパク質をコードする遺伝子は、使用する宿主に応じて、および望みの活性を得るために改変することができ、それらには1以上のアミノ酸の付加、欠失、置換などが含まれ、必要により宿主のコドン使用頻度に応じて最適なコドンに変換してもよい。

天然でプレプロペプチドとして発現されるタンパク質を本発明によって分泌生産する場合は、プロ構造部（プロ部分）を含むプロタンパク質をコードする遺伝子断片を使用することが好ましい。プロ構造部の配列の例として、放線菌由来トランスグルタミナーゼのプロ構造部の配列を配列番号3（*S. mobaraense*由来）および配列番号4（*S. cinnamoneum*由来）に示した。タンパク質のプロ構造部は適当な手段、例えばプロテアーゼによって切断すればよく、アミノペプチダーゼ、適切な位置で切断するエンドペプチダーゼ、あるいは、より特異的なプロテアーゼを使用することができるが、その結果生じるタンパク質が天然のタンパク質と同等またはそれ以上の活性を有するような位置で切断するプロテアーゼが好ましい。あるいは、目的タンパク質または目的タンパク質のプロ構造部をコードする遺伝子配列を改変して、望みの位置に特異的なプロテアーゼの認識部位を有するタンパク質を発現するように設計することもできる。このような改変技術、遺伝子のクローニング技術、生産されたタンパク質の検出技術を含む、一般的な分子生物学的手法は当業者によく知られたものであり、例えば、Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition (1989) Cold

Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York、DNA cloning: A Practical Approach, Volumes I and II (D.N. Glover ed. 1985)、F.M. Ausubel et al.(eds), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. (1994)、PCR Technology:Principles and Application for DNA Amplification, H. Erlich, ed., Stockton Press等を参照することができる。

配列番号3および4に示したプロ構造部を改変したプロ構造部の例としては、配列番号30～38に記載したアミノ酸配列を有する改変プロ構造部が挙げられる。

<配列表フリーテキスト>

配列番号30～37:S. mobaraenceのトランスグルタミナーゼの改変プロ構造部

配列番号38:S.mobaraenceとS. cinnamoneumのトランスグルタミナーゼプロ構造部のキメラ

これらの改変プロ構造部は以下のような特徴を有する:

配列番号30=S.mobaraence由来プロ構造部(45アミノ酸残基)のC末のAPが欠失している

配列番号31=S.mobaraence由来プロ構造部(45アミノ酸残基)のC末のFRAPが欠失している

配列番号32=S.mobaraence由来プロ構造部(45アミノ酸残基)のN末のDが欠失している

配列番号33=S.mobaraence由来プロ構造部(45アミノ酸残基)のN末のDNGAGEが欠失している

配列番号34=S.mobaraence由来プロ構造部(45アミノ酸残基)のC末のRAPがGPKに改変されている

配列番号35=S.mobaraence由来プロ構造部(45アミノ酸残基)のC末のRAPがGP

Rに改変されている

配列番号36=S.mobaraence由来プロ構造部(45アミノ酸残基)のC末のGPSFRAPがGPKに改変されている(FRAPが欠失し、C末のSがKに改変されている)

配列番号37=S.mobaraence由来プロ構造部(45アミノ酸残基)のC末のGPSFRAPがGPRに改変されている(FRAPが欠失し、C末のSがRに改変されている)

配列番号38=S.mobaraence由来プロ構造部の一部(15アミノ酸残基)とS.cinnamoneum由来プロ構造部(41アミノ酸残基)の一部からなるキメラプロ構造部(56アミノ酸残基)

このように、所定の位置にプロテアーゼの特異的認識部位を有する限り、プロ構造部において、1または複数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入または付加されていてもよい。

プロテアーゼ分解の結果得られるタンパク質のN末端領域は必ずしも天然のタンパク質と同一でなくてもよく、1～数個のアミノ酸を余分に付加された、あるいは欠失したものであってもよい。一般には、そのタンパク質の活性という観点から、天然のタンパク質とほぼ同じ位置で切断されることが好ましく、天然のものと同じの成熟ペプチドであることがより好ましい。例えば、S. mobaraenseおよびS. cinnamoneumの成熟型トランスグルタミナーゼについてはその配列が配列番号5および43にそれぞれ示されるものである。従って、一般には、天然に生じる成熟タンパク質と同一のタンパク質を生じる位置でプロペプチドを切断する特異的プロテアーゼが最も好ましい。しかしながら、特定の目的については、天然のタンパク質に比較してN末端がアミノ酸1～数個分長いあるいは短いペプチドがより適切な活性を有することがある。そのようなプロテアーゼにはDispace(ベーリンガーマンハイム社製)のような商業的に入手できるものの他、微生物の培養液、例えば放線菌の培養液等から得られるものが含まれる。そのようなプロテアーゼは未精製状態で使用することもでき、必要に応じて適当な純度まで精製し

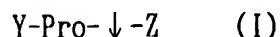
た後に使用してもよい。

他の好適なプロテアーゼの例としては、ストレプトマイセス・アルボグリセオラス (*Streptomyces albogriseolus*) (以後、*S. albogriseolus*と略すことがある) の産生するセリンプロテアーゼであるSAMP45がある。*S. mobaraense*のプロトランスグルタミナーゼの場合、SAMP45は、配列番号3のプロ構造部の41番目のSerと42番目のPheの間を優先的に切断するため、配列番号5に示す天然型の成熟トランスグルタミナーゼのN末端にプロ構造部のC末端のPhe-Arg-Ala-Proの4個のアミノ酸が付加された構造のタンパク質が生成される。本発明者らは、このようなタンパク質もトランスグルタミナーゼ活性を有していることを確認した。なお、SAMP45遺伝子の配列は既に決定されており、配列番号39にプロ構造の付加したタンパク質(プロSAMP45)のアミノ酸配列を示した(J. Bacteriol., 179, 430-438(1997))。SAMP45は、*S. albogriseolus*の培養液または*S. albogriseolus*菌体の形態でプロトランスグルタミナーゼに作用させた場合にプロ構造部を一部残して切断することができ、その結果、プロ構造部の大部分を除去したトランスグルタミナーゼを得ることができる。あるいは、プレプロSAMP45遺伝子を導入したコリネ型細菌をプロトランスグルタミナーゼを菌体外に分泌生産するコリネ型細菌と共に培養することにより、同様にプロ構造部の大部分を除去したトランスグルタミナーゼを得ることができる。また、プレプロトランスグルタミナーゼの遺伝子を導入したコリネ型細菌にSAMP45遺伝子を同様の方法で導入し、プロトランスグルタミナーゼと同時にSAMP45を菌体表層または菌体外に分泌生産させることにより、プロ構造部の切断によるトランスグルタミナーゼの活性化を効率よく行うことができる。

さらに、本発明者らが見出した、*S. mobaraense*の生産するプロリン特異的ペプチダーゼ(svPEP)をSAMP45と組み合わせて使用することにより、N末端に付加したPhe-Arg-Ala-Proの4個のアミノ酸も除去され、天然型と同一の成熟トランスグ

ルタミナーゼを得ることができる。

このsvPEPは、以下の式(I)で表されるペプチドまたはペプチド類似物を式中↓の箇所、すなわちN末端から3番目または4番目のプロリン残基のカルボキシル側を特異的に切断する酵素である。



(式中、Yは2または3アミノ酸残基からなるオリゴペプチドであり、Zはアミノ酸、ペプチド、アミド、またはエステルである。)

より具体的には、このプロリン特異的ペプチダーゼは、以下の(1)~(8)の性質を有するプロリン特異的ペプチダーゼである。

(1) 以下のプロリン含有ペプチドの少なくとも1つを、↓で示した位置、すなわちプロリンのカルボキシル側で切断する(pNAはp-ニトロアニリドである)。

Ala-Ala-Pro-↓-pNA、Ala-Phe-Pro-↓-pNA、Phe-Arg-Ala-Pro-↓-pNA (Phe-Arg-Ala-Xaa (配列番号68) (式中、XaaはPro-pNAであり、pNAはp-ニトロアニリドを表す。)と同じ)

(2) 至適pHが6.0~6.5である。

(3) pH4~9で安定である。

(4) 至適温度が25~30℃である。

(5) 20℃以下で安定である。

(6) フェニルメチルスルフォニルフルオリド、アミノエチルベンゼンスルフォニルフルオリド・ハイドロクロライドで活性が阻害される。

(7) 等電点が10.2である。

(8) 分子量が約50,000である。

このsvPEPは例えば以下のようにして調製することができる。svPEPの活性を有するペプチダーゼを産生する放線菌、例えば放線菌*S. mobaraense* IF013819を、放線菌の培養に通常用いられる方法に従って培養する。放線菌IF013819を培養する

ための培地としては通常の炭素源、窒素源、無機イオン等を含有する通常の培地でよい。炭素源としてはグルコース、デンプン、ショ糖、その他を用いることができる。窒素源としてはペプトン、酵母エキス、肉エキス、麦芽エキス、アンモニウム塩、その他が必要に応じ適宜使用される。培養は好気条件下で行ない、例えば、pH5.0から8.5、温度を15°Cから37°Cの適当な範囲に制御して行なうことができる。培養期間は温度、pH、培地によって異なるが、通常1～10日程度であり、一般には、目的とする本svPEPの生産が最大に達した頃に培養を停止すればよい。

上述した期間の培養後、培養物から菌体を回収し、軽く洗浄後、菌体表層よりsvPEPを含む画分を溶出し、HPLC、FPLC等の通常タンパク質の精製に使用される、当業者によく知られた各種の精製手段を組み合わせることによって精製svPEP標品を得ることができる。菌体表層からのsvPEP画分の溶出は例えば0.1Mのリン酸ナトリウムバッファー(pH7.0)等のバッファー中で一定時間、1～5時間程度振盪することによって行なうことができる。この時の温度は酵素の失活を防止するため0°C～約5°Cが好ましい。svPEPは培養上清液からも精製単離することも可能だが、夾雑タンパク質が多く、洗浄菌体表層から溶出精製する方が有利である。

なお、各段階での活性画分の確認はその画分中の酵素活性を測定することによって行なうことができる。酵素活性の測定は、適切な基質および反応生成物の検出方法を組み合わせて行なうことができ、例えばAla-Ala-Pro-pNA、Ala-Phe-Pro-pNA、Phe-Arg-Ala-Pro-pNA、を基質として酵素を反応させ、遊離したpNA (p-ニトロアニリド) の量を算出することにより活性を定量することによって行なうことができる。

このようにして精製したsvPEPを必要に応じて、逆相クロマトグラフィー等を用いてさらに純化し、その部分アミノ酸配列を決定し、適切なプローブを設計することによりsvPEPをコードする遺伝子を得ることができる。このような手順は当業者によく知られたものであり、例えば、Molecular Cloning 2nd edition[J. Sam

brook E. F. Fritsch and T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, p9.31(1989)]を参照すればよい。このようにして得られたsvPEPの遺伝子の塩基配列とそれにコードされる全アミノ酸配列をそれぞれ配列番号41および42に、svPEPの成熟タンパク質のアミノ酸配列を配列番号40に示す。

svPEPは、*S.mobaraence*の培養液または*S.mobaraence*菌体の形態でプロテアーゼと共にプロトランスグルタミナーゼに作用させた場合に、プロ構造部を完全に切断することができ、この結果、プロ構造部が完全に除去された成熟型トランスグルタミナーゼを得ることができる。あるいは、プレプロsvPEP遺伝子及びプロテアーゼ遺伝子を導入したコリネ型細菌をプロトランスグルタミナーゼを菌体外に分泌生産するコリネ型細菌と共に培養することにより、同様にプロ構造部が完全に除去された成熟型トランスグルタミナーゼを得ることができる。また、プレプロトランスグルタミナーゼの遺伝子を導入したコリネ型細菌にSAMP45遺伝子とsvPEP遺伝子の両方を同様の方法で導入し、プロトランスグルタミナーゼ及びSAMP45と同時にsvPEPを菌体表面または菌体外に分泌生産させることにより、天然と同一の構造を持つ成熟型トランスグルタミナーゼの生産を効率よく行うことができる。

本発明に使用し得る遺伝子構築物のコリネ型細菌への導入方法は特に限定されず、一般に使用される方法、例えば、プロトプラスト法(Gene, 39, 281-286(1985))、エレクトロポレーション法(Bio/Technology, 7, 1067-1070)(1989))等を使用することができる。得られた遺伝子導入形質転換体は通常用いられる方法および条件に従って培養することができる。例えば、形質転換体は炭素源、窒素源、無機イオンを含有する通常の培地で培養することができる。さらに高い増殖を得るために、ビタミン、アミノ酸等の有機微量栄養素を必要に応じて添加することもできる。

炭素源としてはグルコースおよびシュークロースのような炭水化物、酢酸のような有機酸、アルコール類、その他を使用することができる。窒素源としては、

アンモニアガス、アンモニア水、アンモニウム塩、その他が使用できる。無機イオンとしては、カルシウムイオン、マグネシウムイオン、リン酸イオン、カリウムイオン、鉄イオン等を必要に応じて適宜使用する。培養はpH5.0～8.5、15℃～37℃の適切な範囲にて好氣的条件下で行い、1～7日間程度培養する。このような条件下で形質転換体を培養することにより、目的タンパク質は菌体内で多量に生産され効率よく菌体外に分泌される。トランスグルタミナーゼについては、微生物の菌体内で多量に蓄積すると一般に致死的事であることが知られているが、本発明によれば生産されたトランスグルタミナーゼは菌体外に放出されるため、致死的影響を受けることなく連続的にトランスグルタミナーゼが生産される。

本発明によって培地中に分泌されたタンパク質は、当業者によく知られた方法に従って培養後の培地から分離精製することができる。例えば、菌体を遠心分離等により除去した後、塩析、エタノール沈殿、限外濾過、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換カラムクロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、中高压液体クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー等の既知の適切な方法、またはこれらを組み合わせることにより分離精製することができる。本発明によって菌体表層に分泌されたタンパク質も当業者によく知られた方法、例えば塩濃度の上昇、界面活性剤の使用等によって可溶化した後に、培地中に分泌された場合と同様にして分離精製することができる。また、ある場合には、菌体表層に分泌されたタンパク質を可溶化せずに、例えば固定化酵素として使用しても良い。

本発明は以下の実施例によって、更に具体的に説明されるが、これらはいかなる意味でも本発明を限定するものと解してはならない。

実施例

実施例 1 : S. mobaraense IF013819由来のプレプロトランスグルタミナーゼのC.
glutamicum ATCC13869における発現

(1) S. mobaraense IF013819由来トランスグルタミナーゼ

遺伝子の取得

S. mobaraense DSMZ株由来トランスグルタミナーゼ遺伝子の配列は既に決定されている[Eur. J. Biochem., 257, 570-576(1998)]。この配列を参考にして、配列番号8と配列番号9に示したプライマーを合成し、常法に従って(斉藤、三浦の方法[Biochim. Biophys. Acta, 72, 619(1963)])調製したS. mobaraense IF013819の染色体DNAから成熟トランスグルタミナーゼ配列をコードする領域をPCR法にて増幅した。PCR反応にはPyrobest DNA polymerase(宝酒造社製)を用い、反応条件は業者の推奨するプロトコルに従った。

(配列番号8) 5'-GACTCCGACGACAGGGTCACCCCTCCCGCC-3'

(配列番号9) 5'-CGCTCACATCACGGCCAGCCCTGCTTTACC-3'

<配列表フリーテキスト>

配列番号8、9 : PCRプライマー

次に増幅した約1.0kbのDNA断片を、Random Primer DNA Labeling Kit Ver.2(宝酒造社製)と $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTPを用いて、添付のプロトコルに従って反応させ、DNAプローブを作製した。作製したプローブとS. mobaraense IF013819の染色体DNAを用いて、Molecular Cloning 2nd edition[J. Sambrook, E. F. Fritsch and T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, p9.31(1989)]に記載されているような一般的な方法に従って、サザンブロットハイブリダイゼーションを行ったところ、制限酵素Sac Iで切り出される約4 kbの断片にトランスグルタミナーゼ遺伝子が存在していることが確認できた。そこでS. mobaraense IF013819の染色体DNAをSac Iで消化した約4 kbの断片をEASYTRAP V

er.2 (宝酒造社製) を用いてアガロースゲル電気泳動により回収し、これをpUC18 (宝酒造社製) のSacI部位に挿入した後、Escherichia coli JM109 (宝酒造社製) のコンピテントセルに導入し、ライブラリーを作製した。

先に作製したトランスグルタミナーゼのDNAプローブを用いて、Molecular Cloning 2nd edition[J. Sambrook, E. F. Fritsch and T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, p1.90(1989)]記載のコロニーハイブリダイゼーションにより、ライブラリーのスクリーニングを行い、トランスグルタミナーゼ遺伝子断片がクローン化されたプラスミドを保持する菌株を取得し、これよりプラスミドを回収し、pUITGと名付けた。pUITGにクローン化されている断片の塩基配列を決定したところ、S. mobaraense IF013819のトランスグルタミナーゼの遺伝子は、S. mobaraense DSMZ株のトランスグルタミナーゼの遺伝子と同じ塩基配列を有することが確認された。

塩基配列の決定の結果、このSacIの約4 kbの断片はシグナル配列 (プレ部分) が一部欠けた不完全なDNA断片であることが判明した。そこでプロモーター領域と完全なシグナル配列領域のクローニングを試みた。クローニングはTAKARA LA PCR in vitro Cloning Kit (宝酒造社製) と配列番号10及び配列番号11に示した合成プライマーを利用し、添付のプロトコルに従って実施した。

(配列番号10) 5'-GTGACCCTGTCGTCGGAGTC-3'

(配列番号11) 5'-GGCATCCTGTCGAGCGGCTC-3'

<配列表フリーテキスト>

配列番号10、11 : S. mobaraenseのプロモーター領域およびシグナル配列のためのPCRプライマー

その結果、SalIのカセットプライマーを用いたときに約800 bpのPCR増幅断片が得られ、この断片の塩基配列を決定したところトランスグルタミナーゼ遺伝子のプロモーター領域とシグナル配列領域を含む断片であることが確認され

た。そこで、この約800bpのPCR増幅断片を特開平9-070291記載のpVC7のSmaI部位に挿入することによって、pVITGS5を得た。さらにpUITGをSacIで消化することにより、トランスグルタミナーゼ遺伝子を含む約4kbの断片をアガロースゲル電気泳動により回収し、この断片をpVITGS5のSacI部位に挿入し、完全長のトランスグルタミナーゼ遺伝子を含むプラスミドpVITGCを構築した。尚、塩基配列の決定はダイターミネーターサイクルシーケンシングキット（PEアプライドバイオシステムズ社製）とDNAシーケンサー373A（PEアプライドバイオシステムズ社製）を用いて行った。配列番号12にプレプロトランスグルタミナーゼ遺伝子の配列を示したが、N末端の31アミノ酸配列がシグナル配列（プレ部分）であると考えられた。プレプロトランスグルタミナーゼのアミノ酸配列は配列番号13に示した。

（2）トランスグルタミナーゼ遺伝子プロモーター領域の変換

*C. glutamicum*の細胞表面タンパク質であるPS2の遺伝子の配列は既に決定されている[Mol. Microbiol., 9, 97-109(1993)]。この配列を参考にして配列番号14と配列番号15に示したプライマーを合成し、常法に従って調製した*C. glutamicum* ATCC13869の染色体DNAからPS2タンパク質遺伝子のイニシエーションコドンの5'-上流域のプロモーターを含む領域をPCR法にて増幅した。

（配列番号14）5'-AAATTCCTGTGAATTAGCTGATTTAG-3'

（配列番号15）5'-GAGCTCTCCGGCGTATGCGCATAGAGGCGAAGGCTCCTTGAATA-3'

<配列表フリーテキスト>

配列番号14、15：PCRプライマー

一方、実施例1（1）で決定したトランスグルタミナーゼの遺伝子配列をもとに配列番号16と配列番号9に示したプライマーを合成し、実施例1（1）で取得したpUITGからプレプロトランスグルタミナーゼの遺伝子領域をPCR法にて増幅した。

(配列番号 16) 5'-ATGCGCATACGCCGAGAGCTCTCGTCTTC-3'

<配列表フリーテキスト>

配列番号 16 : PCRプライマー

次に、増幅させた*C. glutamicum* ATCC13869のPS2遺伝子のプロモーターを含む領域と、やはり増幅させたブレプロトランスグルタミナーゼの遺伝子領域のPCR反応液1 μ lを混ぜて鋳型とし、配列番号14と配列番号9を用いてクロスオーバーPCRを行い、*C. glutamicum* ATCC13869の細胞表層タンパク質遺伝子のプロモーターを含む領域に接続されたブレプロ構造部付きトランスグルタミナーゼの融合遺伝子を増幅させた。アガロースゲル電気泳動により約1.8 kbの増幅断片を検出した。この断片をEASYTRAP Ver.2 (宝酒造社製)を用いてアガロースゲルから回収し、特開平9-070291記載のpVC7のSmaI部位に挿入することによって、pVKPTG0を得た。前述の方法に従って、挿入断片の塩基配列の決定を行い、予想通りの融合遺伝子が構築されていることを確認した。

(3)ブレプロトランスグルタミナーゼ遺伝子の*C. glutamicum* ATCC13869での発現

実施例1(1)で構築したpVITGC(プロモーターおよびブレプロトランスグルタミナーゼ遺伝子のすべてが*S. mobaraense*由来)あるいは、実施例1(2)で構築したpVKPTG0(プロモーターは*C. glutamicum* ATCC13869のPS2遺伝子由来で、ブレプロトランスグルタミナーゼ遺伝子は*S. mobaraense*由来)で*C. glutamicum* ATCC13869を形質転換し、5 mg/lのクロラムフェニコールを含むCM2S寒天培地(酵母エキストラクト 10 g、トリプトン 10 g、シュークロース 5 g、NaCl 5 g、寒天 15 g、水で1 Lにする)で生育した菌株を選択した。次に、選択したpVITGCあるいは、pVKPTG0を有する*C. glutamicum* ATCC13869を、5 mg/lのクロラムフェニコールを含むMM液体培地(グルコース 30 g、硫酸マグネシウム七水和物 0.4 g、硫酸アンモニウム 30 g、リン酸二水素カ

リウム 1 g、硫酸鉄七水和物 0.01 g、硫酸マンガン五水和物 0.01 g、チアミン塩酸塩 200 μ g、ビオチン 500 μ g、DL-メチオニン 0.15 g、炭酸カルシウム 50 g、水で1 LにしてpH 7.5に調整)でそれぞれ30°C、48時間培養した。培養終了後10 μ lの培養上清をSDS-PAGEに供してから、Biosci. Biotechnol. Biochem., 58, 82-87(1994)記載の抗トランスグルタミナーゼ抗体を用いて、常法に従って(例えば、J. Sambrookら(1989)(前述)に記載されるような一般的な手順)ウエスタンブロットを行った。

その結果トランスグルタミナーゼの分泌を検出することはできなかった。以上の結果よりS. mobaraenseのトランスグルタミナーゼのシグナル配列はC. glutamicum ATCC13869においては機能しないことが確認された。

実施例2：コリネバクテリウム・グルタミカム (C. glutamicum ATCC13869) の細胞表層タンパク質のシグナルペプチドおよびS. mobaraense IF013819由来の成熟トランスグルタミナーゼをコードする融合遺伝子を用いた成熟トランスグルタミナーゼの分泌生産

(1) C. glutamicum ATCC13869の細胞表層タンパク質のシグナル配列を有するトランスグルタミナーゼ遺伝子の構築

C. glutamicumの細胞表層タンパク質であるPS2の遺伝子の配列は既に決定されている[Mol. Microbiol., 9, 97-109(1993)]。この配列を参考にして配列番号14と配列番号17に示したプライマーを合成し、実施例1(2)の方法により調製したC. glutamicum ATCC13869の染色体DNAからPS2に相当するタンパク質のN末端側アミノ酸44残基(シグナルペプチド30アミノ酸残基と成熟細胞表層タンパク質の14アミノ酸残基)をコードする領域とプロモーター領域を含む5'-上流域とをPCR法にて増幅した。また配列番号17に示したプライマーはトランスグルタミナーゼとの融合遺伝子を構築するために、成熟トランスグルタミナーゼのN末端側のアミノ酸配列をコードする配列を含んでいる。

(配列番号 14) 5'-AAATTCCTGTGAATTAGCTGATTTAG-3'

(配列番号 17) 5'-GGGGTGACCCTGTCGTCGGAGTCGTTGAAGCCGTTGTTGATGTTGAA-3'

<配列表フリーテキスト>

配列番号 17 ; PCRプライマー

一方、実施例 1 (1) で決定したトランスグルタミナーゼの遺伝子配列をもとに配列番号 8 と配列番号 9 に示したプライマーを合成し、実施例 1 (1) で取得した pUITG から成熟トランスグルタミナーゼの遺伝子領域を PCR 法にて増幅した。

次に、増幅させた *C. glutamicum* ATCC13869 の PS2 に相当するタンパク質の N 末端側アミノ酸 44 残基をコードする領域とプロモーター領域を含む 5'-上流域との PCR 反応液 1 μ l と、やはり増幅させた成熟トランスグルタミナーゼの遺伝子領域の PCR 反応液 1 μ l を混ぜて鋳型とし、配列番号 14 と配列番号 9 を用いてクロスオーバー PCR を行い、*C. glutamicum* ATCC13869 の細胞表層タンパク質遺伝子のプロモーター領域を含む 5'-上流域と N 末端側アミノ酸 44 残基をコードする領域に接続された成熟トランスグルタミナーゼの融合遺伝子を増幅させた。

アガロースゲル電気泳動により約 1.7 kb の増幅断片を検出した。この断片を EASYTRAP Ver.2 (宝酒造社製) を用いてアガロースゲルから回収し、特開平 9-070291 記載の pVC7 の SmaI 部位に挿入することによって、pVKTG3 を得た。前述の方法に従って、挿入断片の塩基配列の決定を行い、予想通りの融合遺伝子が構築されていることを確認した。

また、pVKTG3 を KpnI と XbaI を用いて消化することにより、約 1.7 kb の *C. glutamicum* ATCC13869 の細胞表層タンパク質遺伝子のプロモーター領域を含む 5'-上流域と N 末端側アミノ酸を 44 残基コードする領域に接続された成熟トランスグルタミナーゼの融合遺伝子を切り出し、アガロースゲル電気泳動により回収し

た。この断片を特開平 9 - 3 2 2 7 7 4 記載の pPK4 の KpnI - XbaI 部位に挿入することによって、pPKTG3 を構築した。

(2) *C. glutamicum* ATCC13869 の細胞表層タンパク質のシグナル配列を用いての成熟トランスグルタミナーゼの分泌

構築したプラスミド pVKTG3 あるいは pPKTG3 (両者ともにプロモーターとシグナルペプチドおよび N 末端 14 アミノ酸残基からなる遺伝子は *C. glutamicum* ATCC13869 由来で、成熟トランスグルタミナーゼ遺伝子は *S. mobaraense* 由来) を用いて、*C. glutamicum* ATCC13869 を形質転換し、5 mg/l のクロラムフェニコールあるいは 25 mg/l のカナマイシンを含む CM2S 寒天培地で生育した菌株を選択した。次に、選択した pVKTG3 あるいは pPKTG3 を有する *C. glutamicum* ATCC13869 を、5 mg/l のクロラムフェニコールあるいは 25 mg/l のカナマイシンを含む上記 MM 液体培地で 30℃、48 時間培養した。培養終了後、10 μl の培養上清を SDS-PAGE に供してから、Biosci. Biotechnol. Biochem., 58, 82-87 (1994) 記載の抗トランスグルタミナーゼ抗体を用いて、常法に従ってウエスタンブロットを行った。その結果、両菌株において培養上清に成熟トランスグルタミナーゼとほぼ同じ分子量を有する、分泌されたトランスグルタミナーゼを少量検出する事ができた。

実施例 3 : *C. glutamicum* ATCC13869 の細胞表層タンパク質のシグナルペプチドに結合した *S. mobaraense* IF013819 由来のプロトランスグルタミナーゼ融合遺伝子 (異種融合プレプロトランスグルタミナーゼ遺伝子) を用いたプロトランスグルタミナーゼの分泌生産

(1) *C. glutamicum* ATCC13869 の細胞表層タンパク質のシグナル配列を有するプロ構造部付きトランスグルタミナーゼ遺伝子 (異種融合プレプロトランスグルタミナーゼ遺伝子) の構築

C. glutamicum の細胞表層タンパク質である PS2 の遺伝子配列 [Mol. Microbio

1., 9, 97-109(1993)]を参考にして、配列番号18、配列番号19、配列番号20、そして配列番号21に示したプライマーを合成した。実施例1(2)の方法により調製した*C. glutamicum* ATCC13869の染色体DNAから、配列番号14と配列番号18、あるいは配列番号14と配列番号19、あるいは配列番号14と配列番号20、あるいは配列番号14と配列番号21の組み合わせにより、PS2に相当するタンパク質のN末端側アミノ酸をそれぞれ30、31、44、および68残基コードする領域(シグナルペプチド30アミノ酸残基を含む)とプロモーター領域を含む5'-上流域とをPCR法にて増幅した。

配列番号18、配列番号19、配列番号20、そして配列番号21に示したプライマーはプロ構造部付きトランスグルタミナーゼとの融合遺伝子を構築するために、プロトランスグルタミナーゼのN末端側のアミノ酸をコードする配列を含んでいる。

(配列番号18) 5'-CTTCGTCTCTTCCCCGCGCCATTGTCAGCGAATGCTGGGATAGCAACGCC-3

(配列番号19) 5'-CTTCGTCTCTTCCCCGCGCCATTGTCCTGAGCGAATGCTGGGATAGCTAC-3

(配列番号20) 5'-CTTCGTCTCTTCCCCGCGCCATTGTCGTTGAAGCCGTTGTTGATGTTGAA-3

(配列番号21) 5'-CTTCGTCTCTTCCCCGCGCCATTGTCAGTCAGGTCGCGGAGGGTTTCCTC-3

<配列表フリーテキスト>

配列番号18～21: PCRプライマー

一方、実施例1(1)で決定したトランスグルタミナーゼの遺伝子配列をもとに配列番号22と配列番号9に示したプライマーを合成し、実施例1(1)で取得したpUITGからプロトランスグルタミナーゼの遺伝子領域をPCR法にて増幅した。

(配列番号22) 5'-GACAATGGCGCGGGGAAGAGACGAAGTCC-3'

<配列表フリーテキスト>

配列番号22: PCRプライマー

次に、それぞれ増幅させた*C. glutamicum* ATCC13869のPS2に相当するタンパク質遺伝子のプロモーター領域を含む5'-上流域とN末端側アミノ酸30、31、44、および68残基をコードする領域のPCR反応液各々1 μ lと、やはり増幅させたプロ構造部付きトランスグルタミナーゼの遺伝子領域のPCR反応液1 μ lを混ぜて鋳型とし、配列番号14と配列番号9を用いてクロスオーバーPCRを行い、それぞれ*C. glutamicum* ATCC13869のPS2に相当するタンパク質遺伝子のプロモーター領域を含む5'-上流域およびN末端側アミノ酸30、31、44、および68残基をコードするそれぞれの領域に接続されたプロトランスグルタミナーゼとの融合遺伝子、すなわち、*C. glutamicum* ATCC13869表層タンパク質遺伝子のプロモーターに結合した異種融合プレプロトランスグルタミナーゼ遺伝子断片を増幅させた。

アガロースゲル電気泳動により、それぞれ約1.8 kbから1.9 kbの増幅断片を検出した。この断片をEASYTRAP Ver.2（宝酒造社製）を用いてアガロースゲルから回収し、特開平9-070291記載のpVC7のSmaI部位に挿入することによって、それぞれpVKPTG1、pVKPTG2、pVKPTG3、そしてpVKPTG4を得た。前述の方法に従って挿入断片の塩基配列の決定を行い、予想通りの融合遺伝子が構築されていることを確認した。

また、pVKPTG1、pVKPTG2、pVKPTG3、そしてpVKPTG4をKpnIとXbaIを用いて消化することにより、約1.8 kbから1.9 kbの*C. glutamicum* ATCC13869のPS2に相当するタンパク質遺伝子のプロモーター領域を含む5'-上流域とN末端側アミノ酸30、31、44、および68残基をコードするそれぞれの領域に接続されたプロ構造部付きトランスグルタミナーゼの融合遺伝子を切り出し、アガロースゲル電気泳動により回収した。これらの断片を特開平9-322774記載のpPK4のKpnI-XbaI部位に挿入することによって、pPKPTG1、pPKPTG2、pPKPTG3、そしてpPKPTG4を構築した。

(2) *C. glutamicum* ATCC13869の細胞表層タンパク質のシグナル配列を用いての
プロトランスグルタミナーゼの分泌

構築したプラスミドpVKPTG1、pVKPTG2、pVKPTG3、pVKPTG4、pPKPTG1、pPKPTG2、
pPKPTG3、あるいはpPKPTG4を用いて*C. glutamicum* ATCC13869を形質転換し、5 m
g/lのクロラムフェニコールあるいは25 mg/lのカナマイシンを含む上記CM2
S寒天培地で生育した菌株を選択した。次に、選択したpVKPTG1、pVKPTG2、pVKP
TG3、pVKPTG4、pPKPTG1、pPKPTG2、pPKPTG3、あるいはpPKPTG4を有する*C. gluta*
micum ATCC13869を、5 mg/lのクロラムフェニコールあるいは25 mg/lのカナマイ
シンを含む上記MM液体培地でそれぞれ30℃、48時間培養した。培養終了後
10 μ lの培養上清をSDS-PAGEに供してから、Biosci.Biotechnol.Bioc
hem., 58, 82-87(1994)記載の抗トランスグルタミナーゼ抗体を用いて、常法に従
ってウエスタンブロットを行った。その結果、pVC7あるいはpPK4のどちらのベク
ターでも、ほぼ同量のプロ構造部付きトランスグルタミナーゼの分泌が確認され
たが、PS2に相当するタンパク質の成熟タンパク質のN末端側アミノ酸残基の長さ
に応じて分泌量に有意な差違が認められた。代表的な分泌量を表1に示した。

表1. *C. glutamicum* ATCC13869の細胞表層タンパク質のシグナル配列を用いての
プロトランスグルタミナーゼの分泌生産量

プラスミド	プロトランスグルタミナーゼ(mg/l)
pPKPTG1	78
pPKPTG4	210

(3) Dispase消化によるプロトランスグルタミナーゼの切断と活性の検出

pVKPTG1、pVKPTG2、pVKPTG3、pVKPTG4、pPKPTG1、pPKPTG2、pPKPTG3、あるいは
pPKPTG4を有する*C. glutamicum* ATCC13869の培養上清にプロテアーゼであるDisp
ase (ベーリンガーマンハイム社製) を基質：酵素＝1：1となるように添加し、

pH 7.5、37℃ 1時間反応を行った。Dispase消化反応後、SDS-PAGEを行いプロトランスグルタミナーゼの切断を確認し、さらにヒドロキサメート法[J. Biol. Chem., 241, 5518-5525(1966)]にてトランスグルタミナーゼ活性を確認したところ、天然型とほぼ同じ比活性(約20 U/mg)を有する事が確認できた。

実施例4：コリネバクテリウム・アンモニアゲネス (C. ammoniagenes) の細胞表層タンパク質のシグナル配列、およびS. mobaraense IF013819由来のプロトランスグルタミナーゼをコードする配列を有する融合遺伝子を用いたプロトランスグルタミナーゼの分泌生産

(1) C. ammoniagenesの細胞表層タンパク質のシグナル配列を有するプロ構造部付きトランスグルタミナーゼ遺伝子(異種融合プレプロトランスグルタミナーゼ遺伝子)の構築

C. ammoniagenesの細胞表層タンパク質(SlpA)の遺伝子配列[特開平10-108675]を参考にして配列番号23と配列番号24に示したプライマーを合成し、常法に従って調製したC. ammoniagenesの染色体DNAから細胞表層タンパク質(SlpA)遺伝子のプロモーター領域を含む5'-上流域とN末端側アミノ酸25残基(シグナルペプチド)をコードする領域をPCR法にて増幅した。また配列番号24に示したプライマーはプロトランスグルタミナーゼとの融合遺伝子を構築するために、プロトランスグルタミナーゼのN末端側のアミノ酸をコードする配列を含んでいる。

(配列番号23) 5'-GCCCAGAAGCCCCAAAATTGAGATTT-3'

(配列番号24) 5'-CTTCGTCTCTTCCCCGCGCCATTGTCTGCCGTTGCCACAGGTGCGGCCAGC-3'

<配列表フリーテキスト>

配列番号 23、24 : PCRプライマー

次に、増幅させた*C. ammoniagenes*の細胞表層タンパク質(SlpA)遺伝子のプロモーター領域を含む5' - 上流域とN末端側アミノ酸25残基をコードする領域のPCR反応液1 μ lと、実施例3(1)で増幅させたプロ構造部付きトランスグルタミナーゼの遺伝子領域のPCR反応液1 μ lを混ぜて鋳型とし、配列番号23と配列番号9を用いてクロスオーバーPCRを行い、*C. ammoniagenes*の細胞表層タンパク質(SlpA)遺伝子のプロモーター領域を含む5' - 上流域とN末端側アミノ酸25残基をコードする領域に接続されたプロ構造部付きトランスグルタミナーゼの融合遺伝子(異種融合プレプロトランスグルタミナーゼ遺伝子)を増幅させた。アガロースゲル電気泳動により、約1.7 kbの増幅断片を検出した。この断片をEASYTRAP Ver.2(宝酒造社製)を用いてアガロースゲルから回収し、pVC7のSmaI部位に挿入することによってpVSPTG1を得た。

(2) プロモーター領域の変換;*C. glutamicum* ATCC13869の細胞表層タンパク質遺伝子のプロモーターとの結合

*C. glutamicum*の細胞表層タンパク質であるPS2の遺伝子配列[Mol. Microbio 1., 9, 97-109(1993)]を参考にして配列番号14と配列番号25に示したプライマーを合成した。実施例1(2)の方法により調製した*C. glutamicum* ATCC13869の染色体DNAからPS2に相当するタンパク質遺伝子のプロモーター領域を含む5' - 上流域をPCR法にて増幅した。また配列番号25に示したプライマーは*C. ammoniagenes*の細胞表層タンパク質(SlpA)のシグナル配列を有するプロ構造部付きトランスグルタミナーゼ遺伝子との融合遺伝子(異種融合プレプロトランスグルタミナーゼ遺伝子)を構築するために、*C. ammoniagenes*の細胞表層タンパク

質(SlpA)のシグナル配列のN末端側アミノ酸配列をコードする配列を含んでいる。

(配列番号 25) 5'-CGCAGCCAGCGATTTCATGCGTTTCATAGAGGCGAAGGCTCCTTGAATAGGT-3

<配列表フリーテキスト>

配列番号25: PCRプライマー

一方、*C. ammoniagenes*の細胞表層タンパク質(SlpA)のシグナル配列を有するプロ構造部付きトランスグルタミナーゼ遺伝子との融合遺伝子配列をもとに配列番号26と配列番号9に示したプライマーを合成し、実施例4(1)で取得したpVSPTG1から*C. ammoniagenes*の細胞表層タンパク質(SlpA)のシグナル配列を有するプロ構造部付きトランスグルタミナーゼの遺伝子領域をPCR法にて増幅した。

(配列番号 26) 5'-ATGAAACGCATGAAATCGCTGGCTGCGGCG-3'

<配列表フリーテキスト>

配列番号26; PCRプライマー

次に、増幅させた*C. glutamicum* ATCC13869のPS2に相当するタンパク質遺伝子のプロモーター領域を含む5'-上流域のPCR反応液1 μ lと、やはり増幅させた*C. ammoniagenes*の細胞表層タンパク質(SlpA)のシグナル配列を有するプロ構造部付きトランスグルタミナーゼの遺伝子(異種融合プレプロトランスグルタミナーゼ遺伝子)領域のPCR反応液1 μ lを混ぜて鋳型とし、配列番号14と配列番号9を用いてクロスオーバーPCRを行い、*C. glutamicum* ATCC13869のPS2に相当するタンパク質遺伝子のプロモーター領域を含む5'-上流域を有する、*C. ammoniagenes*の細胞表層タンパク質(SlpA)のN末端側アミノ酸25残基をコードする領域に接続されたプロ構造部付きトランスグルタミナーゼの融合遺伝子を

増幅させた。

アガロースゲル電気泳動により約 1.8 kb の増幅断片を検出した。この断片を EASYTRAP Ver.2 (宝酒造社製) を用いてアガロースゲルから回収し、特開平 9-070291 記載の pVC7 の SmaI 部位に挿入することによって pVKSPTG1 を得た。前述の方法に従って、挿入断片の塩基配列の決定を行い、予想通りの融合遺伝子が構築されていることを確認した。

また、pVKSPTG1 を KpnI と XbaI を用いて消化することにより、約 1.8 kb の *C. glutamicum* ATCC13869 の PS2 に相当するタンパク質遺伝子のプロモーター領域を含む 5' - 上流域を有する、*C. ammoniagenes* の細胞表層タンパク質 (SlpA) の N 末端側アミノ酸 25 残基 (シグナルペプチド) をコードする領域に接続されたプロ構造部付きトランスグルタミナーゼの融合遺伝子 (異種融合ブレプロトランスグルタミナーゼ遺伝子) を切り出し、アガロースゲル電気泳動により回収した。この断片を特開平 9-322774 記載の pPK4 の KpnI-XbaI 部位に挿入することによって、pPKSPTG1 を構築した。プラスミド pVKSPTG1 および pPKSPTG1 はともに、プロモーターは *C. glutamicum* ATCC13869 の PS2 遺伝子に由来し、シグナルペプチドは *C. ammoniagenes* の SlpA に由来し、プロトランスグルタミナーゼは *S. mobaraense* に由来する遺伝子で構成されている。

(3) *E. coli* の tac プロモーターへの変換

E. coli の tac プロモーターがクローン化されているプラスミド pKK223-3 (アマシャムファルマシア社製) の配列を参考にして配列番号 27 と配列番号 28 に示したプライマーを合成した。pKK223-3 の DNA から tac プロモーターに相当する領域を PCR 法にて増幅した。また配列番号 28 に示したプライマーは *C. ammoniagenes* の細胞表層タンパク質 (SlpA) のシグナル配列を有するプロ構造部付きトランスグルタミナーゼ遺伝子との融合遺伝子 (異種融合ブレプロトランスグ

ルタミナーゼ遺伝子)を構築するために、*C. ammoniagenes*の細胞表層タンパク質(SlpA)のシグナル配列のN末端側のアミノ酸配列をコードする配列を含んでいる。

(配列番号 27) 5'-GGATCCGGAGCTTATCGACTGCACG-3'

(配列番号 28) 5'-CGCAGCCAGCGATTTTCATGCGTTTCATAATTCTGTTTCCTGTGTGAAATTGT-3'

<配列表フリーテキスト>

配列番号27、28 : PCRプライマー

次に、増幅させた *tac* プロモーターに相当する領域の PCR 反応液 1 μ l と、実施例 4 (2) で増幅させた *C. ammoniagenes* の細胞表層タンパク質(SlpA)のシグナル配列を有するプロ構造部付きトランスグルタミナーゼの遺伝子領域の PCR 反応液 1 μ l を混ぜて鋳型とし、配列番号 27 と配列番号 9 を用いてクロスオーバー PCR を行い、*tac* プロモーターを有する、*C. ammoniagenes* の細胞表層タンパク質(SlpA)のN末端側アミノ酸 25 残基をコードする領域に接続されたプロ構造部付きトランスグルタミナーゼの融合遺伝子(異種融合プレプロトランスグルタミナーゼ遺伝子)を増幅させた。アガロースゲル電気泳動により、約 1.5 kb の増幅断片を検出した。この断片を EASYTRAP Ver.2 (宝酒造社製)を用いてアガロースゲルから回収し、特開平 9-070291 記載の pVC7 の SmaI 部位に挿入することによって pVTSPG1 を得た。前述の方法に従って挿入断片の塩基配列の決定を行い、予想通りの融合遺伝子が構築されていることを確認した。

また、pVTSPG1 を KpnI と XbaI を用いて消化することにより、約 1.5 kb の *tac* プロモーターを有する、*C. ammoniagenes* の細胞表層タンパク質(SlpA)のN末端側アミノ酸を 25 残基コードする領域に接続されたプロ構造部付きトランスグルタミナーゼの融合遺伝子を切り出し、アガロースゲル電気泳動により回収した。この断片を特開平 9-322774 記載の pPK4 の KpnI-XbaI 部位に挿入すること

によって、pPTSPTG1を構築した。プラスミドpVTSPTG1およびpPTSPTG1はともに、*E. coli*由来のtacプロモーター、*C. ammoniagenes*のSlpAに由来するシグナルペプチド、*S. mobaraense*に由来するプロトランスグルタミナーゼ遺伝子で構成されている。

(4) *C. ammoniagenes*の細胞表層タンパク質のシグナル配列を用いてのプロトランスグルタミナーゼの分泌

構築したプラスミドpVKSPGT1、pVTSPTG1、pPKSPGT1、pPTSPTG1を用いて *C. glutamicum* ATCC13869を形質転換し、5 mg/lのクロラムフェニコールあるいは25 mg/lのカナマイシンを含む上記CM2S寒天培地で生育した菌株を選択した。次に選択したpVKSPGT1、あるいはpVTSPTG1、pPKSPGT1、pPTSPTG1を有する *C. glutamicum* ATCC13869を、5 mg/lのクロラムフェニコールあるいは25 mg/lのカナマイシンを含む上記MM液体培地でそれぞれ30℃にて48時間培養した。培養終了後10 μ lの培養上清をSDS-PAGEに供してから、Biosci. Biotechnol. Biochem., 58, 82-87(1994)記載の抗トランスグルタミナーゼ抗体を用いて、常法に従ってウエスタンブロットを行った。その結果、pVC7あるいはpPK4のどちらのベクターでも、ほぼ同量のプロトランスグルタミナーゼの分泌が確認された。代表的な分泌量を表2に示した。

表2. *C. ammoniagenes*の細胞表層タンパク質のシグナル配列を用いたプロトランスグルタミナーゼの分泌生産量

プラスミド	プロトランスグルタミナーゼ(mg/l)
pPKSPGT1	102
pPTSPTG1	74

(5) Dispase消化によるプロトランスグルタミナーゼの切断と活性の検出

pVKSPGT1、pVTSPTG1、pPKSPGT1、あるいはpPTSPTG1を有する *C. glutamicum* AT

CC13869の培養上清にプロテアーゼであるDispase(ベーリンガーマンハイム社製)を基質:酵素=1:1となるように添加し、pH7.5、37℃で1時間反応を行った。Dispase消化反応後、SDS-PAGEを行いプロ構造部付きトランスグルタミナーゼの切断を確認し、さらにヒドロキサメート法にてトランスグルタミナーゼ活性を確認したところ、天然型とほぼ同じ比活性(約20 U/mg)を有する事が確認できた。

実施例5 : S.mobaraenseの培養液および菌体によるプロトランスグルタミナーゼの切断と活性の検出

(1) S. mobaraense IF013819株の培養液によるプロトランスグルタミナーゼの切断と活性の検出

S. mobaraense IF013819株をISP2液体培地(酵母エキストラクト 4g、麦芽エキストラクト 10g、グルコース 4g、水で1LにしてpH7.3に調整)で30℃で24時間培養した。この培養液10mlに、実施例4(5)でも用いたプロトランスグルタミナーゼが蓄積しているpVKSPGTG1、pVTSPTG1、pPKSPGTG1、あるいはpPTSPTG1を有するC. glutamicum ATCC13869の培養上清10mlをメンブランフィルターで濾過後に添加し、30℃で6時間保持した。その後、SDS-PAGEを行いプロ構造部付きトランスグルタミナーゼの切断を確認し、さらにヒドロキサメート法にて天然型とほぼ同じ比活性(約20 U/mg)を有する、トランスグルタミナーゼ活性を確認した。また、SDS-PAGE後、Polyvinylidene-difluoride(PVDF)膜にセミドライブロットニングした(遺伝子クローニングのためのタンパク質構造解析、東京化学同人(1993))。ブロットニング後、PVDF膜をクマシーブリリアントブルーで染色し、脱染、風乾した。成熟トランスグルタミナーゼの部分を切り取り、プロテインシークエンサー(モデル476A、パーキンエルマー社製)でN末端アミノ酸配列の解析を

行った。その結果、配列番号5に示した天然型の成熟トランスグルタミナーゼと同一のN末端アミノ酸配列を有していることが確認された。

(2) *S. mobaraense* IF013819株の菌体によるプロ構造部付きトランスグルタミナーゼの切断と活性の検出

S. mobaraense IF013819株をISP2液体培地で30℃で24時間培養した。この培養液10mlを遠心分離により集菌し、生理食塩水で2回洗浄した。最終的に集菌した菌体を10mlの生理食塩水で懸濁し、実施例4(5)でも用いたプロトランスグルタミナーゼが蓄積しているpVKSPGTG1、pVTSPTG1、pPKSPGTG1、あるいはpPTSPTG1を有する*C. glutamicum* ATCC13869の培養上清10mlをメンブランフィルターで濾過し添加し、30℃で6時間保持した。その後、SDS-PAGEを行いプロ構造部付きトランスグルタミナーゼの切断を確認し、さらにハイドロキサメート法にて、天然型とほぼ同じ比活性(約20U/mg)を有するトランスグルタミナーゼ活性を確認した。また、SDS-PAGE後、PVDF膜にセミドライブロットニングした(遺伝子クローニングのためのタンパク質構造解析、東京化学同人(1993))。ブロットニング後、PVDF膜をクマシーブリリアントブルーで染色し、脱染、風乾した。成熟トランスグルタミナーゼの部分を切り取り、プロテインシークエンサーでN末端アミノ酸配列の解析を行った。その結果、配列番号5に示した天然型の成熟トランスグルタミナーゼと同一のN末端アミノ酸配列を有していることが確認された。

実施例6：*C. ammoniagenes*の細胞表層タンパク質のシグナル配列、および*Streptomyces verticillium* *cinnamomeum* IF012852由来のプロトランスグルタミナーゼをコードする配列を有する融合遺伝子を用いたプロトランスグルタミナーゼの分泌生産

(1) *C. ammoniagenes*の細胞表層タンパク質のシグナル配列、および*S. cinnam*

oniseum IF012852由来のプロトランスグルタミナーゼをコードする配列を有する融合遺伝子の構築

S. cinnamoneum IF012852のトランスグルタミナーゼ遺伝子の配列は既に決定されている(特願平11-295649)。アミノ酸配列の1番目から32番目までがブレ部分の配列、33番目から86番目までがプロ部分の配列、87番目から416番目までが成熟型トランスグルタミナーゼの配列であると推定されている。推定されているプロ構造と成熟タンパク質のアミノ酸配列をそれぞれ配列番号4と配列番号43に示す。また当該遺伝子を含むプラスミドpUJ-MTGで形質転換した*Escherichia coli* AJ13669は、1999年10月14日付けでFERM P-17602として、通商産業省・工業技術院生命工学工業技術研究所(日本国〒305-8566 茨城県つくば市東1丁目1-3)に寄託してあり、2000年8月28日付けでブダペスト条約に基づく寄託に移管され、受託番号FERM BP-7287が付与されている。

まずpUJ-MTGより制限酵素BamHIでブレプロトランスグルタミナーゼ遺伝子の全長をカバーする領域約3.5Kbを切り出し、これをpUC19のBamHI部位に挿入したpUCSCTGを作製した。

pUCSCTGを鋳型として、配列番号44と配列番号45に示したプライマーを合成し、*S. cinnamoniseum* IF012852由来のプロトランスグルタミナーゼを含む遺伝子領域をこれまでと同じようにPCR法にて増幅した。

(配列番号44) 5'-GGC GAT GGG GAA GAG AAG GGG-3'

(配列番号45) 5'-GGC GGA TCC TCG CGT CGA GAG GCG TGG ACT GA-3'

<配列表フリーテキスト>

配列番号44、45: PCRプライマー

次に、実施例4(2)で構築したpPKSPTG1を鋳型として、配列番号46と配列番号47の組み合わせにより、*C. glutamicum*の細胞表層タンパク質であるPS2遺伝子のプロモーター領域を含む5'-上流域と*C. ammoniagenes*の細胞表層タンパク質SI

pAのシグナル配列を含む領域をPCR法にて増幅した。

配列番号47に示したプライマーは*Streptovercillium cinnamoni* IF012852由来のプロトランスグルタミナーゼとの融合遺伝子を構築するために、*Streptovercillium cinnamoni* IF012852由来のプロトランスグルタミナーゼのN末端側のアミノ酸をコードする配列を含んでいる。

(配列番号46) 5'-TAC GAA TTC GAG CTC GGT ACC-3'

(配列番号47) 5'-CCC CTT CTC TTC CCC ATC GCC TGC CGT TGC CAC AGG TGC GGC C-3'

<配列表フリーテキスト>

配列番号46、47: PCRプライマー

次に、増幅させた*S. cinnamoni* IF012852由来のプロトランスグルタミナーゼを含む遺伝子をコードする領域のPCR反応液1 μ lと、やはり増幅させたPS2遺伝子のプロモーター領域を含む5'-上流域と*C. ammoniagenes*の細胞表層タンパク質SlpAのシグナル配列を含む領域のPCR反応液1 μ lを混ぜて鋳型とし、配列番号46と配列番号45を用いてクロスオーバーPCRを行い、PS2遺伝子のプロモーター領域を含む5'-上流域と*C. ammoniagenes*の細胞表層タンパク質SlpAのシグナル配列に接続された異種融合ブレプロトランスグルタミナーゼ遺伝子断片を増幅させた。

アガロースゲル電気泳動により、約1.8kbの増幅断片を検出した。この断片をEcoRIとBamHI消化した後、アガロースゲルから回収し、pUC19のEcoRI-BamHI部位に挿入することによって、pUKSPTG2'を得た。前述した方法に従って、挿入断片の塩基配列の決定を行い、予想通りの融合遺伝子が構築されていることを確認した。このpUKSPTG2'をEcoRIで消化した後、Blunting kit (宝酒造社製)で平滑末端化し、5'-末端がリン酸化された5'-CTCTAGAG-3'の配列を持つXbaIリンカー (宝酒造社製)を挿入し、再環状化しpUKSPTG2を構築した。pUKSPTG2をXbaIを用いて消化

することにより、約1.8kbの融合プレプロトランスグルタミナーゼ遺伝子（プロトランスグルタミナーゼ遺伝子は*S. cinnamonieu*m IF012852由来）を切り出し、アガロースゲル電気泳動により回収した。これらの断片を前述のpPK4のXbaI部位に挿入することによって、pPKSPTG2を構築した。

次にプロ構造部のN末端側の一部が*S. mobaraense*のプロ構造部に置き替わったキメラプロ構造部を有するプレプロトランスグルタミナーゼ遺伝子の構築を行なった（成熟型トランスグルタミナーゼ遺伝子とプロ構造部の一部は*S. cinnamonieu*m IF012852由来）。

まず実施例4(2)で構築されているプラスミドpPKSPTG1（*S. mobaraense* IF013819由来のプロトランスグルタミナーゼ発現用）より、EcoRI-BamHIの約1.8kbのプレプロトランスグルタミナーゼ遺伝子を含む断片を切り出し、pUC19のEcoRI-BamHI部位に挿入した(pUKSPTG1)。pUKSPTG1をAatII消化して約1.2kbの断片を切り出すと共に、pUKSPTG2についてもAatII消化して約1.2kb断片を除去した約3.3kbの断片を調製した。この約3.3kbの断片とpUKSPTG1由来の約1.2kbのAatII断片とをライゲーションし、常法の遺伝子操作法に基づき、AatII断片の挿入されたクローンを選択した。その中でAatII断片の挿入された方向を知るために順次シーケンスを行ない、目的の方向（プレプロトランスグルタミナーゼがコードされている）に挿入されたものを選択した(pUKSPTG3')。さらにpUKSPTG3'についても先にpUKSPTG2'で行なったと同じようにそのEcoRI部位を平滑末端化し、XbaIリンカーを挿入し、pUKSPTG3を構築した。さらにpUKSPTG3よりXbaIの約1.8kb断片を切り出し、pPK4のXbaI部位に挿入することによって、pPKSPTG3を構築した。

(2) *C. ammoniagenes*の細胞表層タンパク質のシグナル配列を用いての*Streptomyces verticillium cinnamonieu*m IF012852由来プロトランスグルタミナーゼの分泌

構築したプラスミドpPKSPTG2およびpPKSPTG3を用いて*C. glutamicum* ATCC1386

9を形質転換し、25mg/lのカナマイシンを含む上記CM2S寒天培地で生育した菌株を選択した。次に、選択したpPKSPTG2およびpPKSPTG3を有する*C. glutamicum* ATCC 13869を、25mg/lのカナマイシンを含むMTG液体培地（グルコース 60 g、硫酸マグネシウム七水和物 0.4 g、硫酸アンモニウム 30 g、リン酸二水素カリウム 1 g、硫酸鉄七水和物 0.01 g、硫酸マンガン五水和物 0.01 g、チアミン塩酸塩 450 μ g、ビオチン 450 μ g、DL-メチオニン 0.15 g、炭酸カルシウム 50 g、水で1 LにしてpH 7.5に調整）でそれぞれ30°C、3日間培養した。培養終了後10 μ lの培養上清をSDS-PAGEに供してから、前述の抗トランスグルタミナーゼ抗体を用いて、常法に従ってウエスタンブロット解析を行った。本抗体は*S. mobaraense*由来のトランスグルタミナーゼに対する抗体であるが、*S. cinnamomeum*由来のトランスグルタミナーゼに対しても反応性を示した。その結果、プロ構造部付き*S. cinnamomeum* IF012852由来トランスグルタミナーゼの分泌が確認された（約30～50mg/L）。

実施例7：S. mobaraense IF013819由来のプロトランスグルタミナーゼのプロ構造部をS. cinnamomeum IF012852由来のプロ構造部にすげ替えること（ハイブリッド体作製）によるプロトランスグルタミナーゼの分泌生産

pPKSPTG2あるいはpPKSPTG3から配列番号14と配列番号48に示したプライマーを合成し、*C. glutamicum* ATCC13869のPS2遺伝子のプロモーター領域を含む5'-上流域と*C. ammoniagenes*の細胞表層タンパク質(SlpA)のシグナル配列、そして*S. cinnamomeum* IF012852由来のトランスグルタミナーゼのプロ構造部配列をコードする領域をそれぞれPCR法にて増幅した。

また配列番号48に示したプライマーは*C. glutamicum* ATCC13869のPS2遺伝子のプロモーター領域を含む5'-上流域と*C. ammoniagenes*の細胞表層タンパク質(SlpA)のシグナル配列、そして*Streptomyces cinnamomeum* IF012852由来の

トランスグルタミナーゼのプロ構造部を有する*S. mobaraense* IF013819由来の成熟トランスグルタミナーゼ遺伝子との融合遺伝子（異種融合プレプロトランスグルタミナーゼ遺伝子）を構築するために、*S. mobaraense* IF013819由来の成熟トランスグルタミナーゼのN末端側アミノ酸配列をコードする配列を含んでいる。

（配列番号14）5'-AAATTCCTGTGAATTAGCTGATTTAG-3'

（配列番号48）5'-GGG GTG ACC CTG TCG TCG GAG TCG GGG GCC CGG GAG GGC GG
G CTG G-3'

<配列表フリーテキスト>

配列番号48：PCRプライマー

一方、実施例1（1）で決定した*S. mobaraense*由来トランスグルタミナーゼの遺伝子配列をもとに配列番号8と配列番号9に示したプライマーを合成し、実施例1（1）で取得したpUITGから*S. mobaraense*由来成熟トランスグルタミナーゼの遺伝子領域をPCR法にて増幅した。

（配列番号8）5'-GACTCCGACGACAGGGTCACCCCTCCCGCC-3'

（配列番号9）5'-CGCTCACATCACGGCCAGCCCTGCTTTACC-3'

<配列表フリーテキスト>

配列番号8、9：PCRプライマー

次に、それぞれ増幅させた*C. glutamicum* ATCC13869のPS2遺伝子のプロモーター領域を含む5'-上流域と*C. ammoniagenes*の細胞表層タンパク質(SlpA)のシグナル配列、そして*S. cinnamoni* IF012852由来のトランスグルタミナーゼのプロ構造部配列をコードする領域のPCR反応液1 μ lと、やはり増幅させた*S. mobaraense* IF013819由来の成熟トランスグルタミナーゼ遺伝子をコードする領域のPCR反応液1 μ lを混ぜて鋳型とし、配列番号14と配列番号9を用いてクロスオーバーPCRを行い、*C. glutamicum* ATCC13869のPS2遺伝子のプロモーター領域を含む5'

-上流域と*C. ammoniagenes*の細胞表層タンパク質(SlpA)のシグナル配列、そして*Streptomyces cinnamomeus* IF012852由来のプロトランスグルタミナーゼのプロ構造部を有する*S. mobaraense* IF013819由来の成熟トランスグルタミナーゼ遺伝子との融合遺伝子断片を増幅させた。アガロースゲル電気泳動により、約1.8kbの増幅断片を検出した。この断片を制限酵素ScaI及びEco065Iで消化することにより生じる約800bpの断片をアガロースゲルから回収し、実施例4(2)で構築したpPKSPTG1の、ScaIとEco065Iで切り出される断片と入れ替えることによりpPKSPTG4およびpPKSPTG5を構築した。

(配列番号14) 5'-AAATTCCTGTGAATTAGCTGATTTAG-3'

(配列番号9) 5'-CGCTCACATCACGGCCAGCCCTGCTTTACC-3'

(2) *C. ammoniagenes*の細胞表層タンパク質のシグナル配列および*S. cinnamomeus* IF012852由来プロ構造部を用いての*S. mobaraense* IF013819由来トランスグルタミナーゼの分泌

構築したプラスミドpPKSPTG4およびpPKSPTG5を用いて*C. glutamicum* ATCC13869を形質転換し、25mg/lのカナマイシンを含む上記CM2S寒天培地で生育した菌株を選択した。次に、選択したpPKSPTG4およびpPKSPTG5を有する*C. glutamicum* ATCC 13869を、25mg/lのカナマイシンを含む上記MMTG液体培地でそれぞれ30℃、3日間培養した。培養終了後10μlの培養上清をSDS-PAGEに供してから、前述の抗トランスグルタミナーゼ抗体を用いて、常法に従って、ウエスタンブロット解析を行った。その結果、*S. cinnamomeus* IF012852由来のプロ構造部付き*S. mobaraense* IF013819由来トランスグルタミナーゼの分泌が確認された。表3にプロトランスグルタミナーゼの生産量を示す。pPKSPTG1は対照区として用いられており、その遺伝子構成上の特色はプロ構造部が*S. mobaraense*由来である。pPKSPTG4はプロ構造部が*S. cinnamomeus*由来という遺伝子構成上の特色がある。pPKSPTG5はプロ構造部がN末端から16アミノ酸が*S. mobaraense*由来で、C末部40アミノ酸が*S. ci*

nnamoniem由来のキメラプロ構造という遺伝子構成上の特色を有している。それ以外については3者共通している。結果はプロ構造のアミノ酸配列の違いにより分泌量に有意な差異が見られた。キメラプロ構造を持つものが最も分泌量が高い(ATCC13869/pPKSPTG5)。

表3. プロ構造部の違いによるプロトランスグルタミナーゼの分泌生産量

プラスミド	プロトランスグルタミナーゼ mg/L
pPKSPTG1	235 mg/L
pPKSPTG4	130
pPKSPTG5	270

実施例8：セリンプロテアーゼ(SAMP45)遺伝子のクローン化と発現プラスミドの作製評価

(1) *C. ammoniagenes*の細胞表層タンパク質のシグナル配列を有するプロ構造部付きセリンプロテアーゼ(SAMP45)遺伝子(異種融合プレプロセリンプロテアーゼ(SAMP45)遺伝子)の構築

*S. albogriseolus*の産生するセリンプロテアーゼであるSAMP45の遺伝子の配列は既に決定されている[J. Bacteriol., 179, 430-438(1997)]。この配列を参考にして配列番号49と配列番号50に示したプライマーを合成し、SAMP45のN末端プロ構造、成熟SAMP45、そしてC末端プロ構造を含む遺伝子領域を先に述べた同じ方法に従いPCR法にて増幅した。

(配列番号49) 5'-AACGGGGAGAACAGCACGGCCGCCGG-3'

(配列番号50) 5'-GGCGAATTCTCCGGCGGGCCGTCACCGGT-3'

<配列表フリーテキスト>

配列番号49、50：PCRプライマー

次に、実施例 4 (2) で構築した pPKSPTG1 を鋳型として、配列番号 5 1 と配列番号 5 2 の組み合わせにより、*C. glutamicum* の細胞表層タンパク質 PS2 遺伝子のプロモーター領域を含む 5'-上流域と *C. ammoniagenes* の細胞表層タンパク質 SlpA 遺伝子のシグナル配列を含む領域を同じく PCR 法にて増幅した。

配列番号 5 2 に示したプライマーはプロ構造部付きセリンプロテアーゼとの融合遺伝子を構築するために、プロセリンプロテアーゼの N 末端側のアミノ酸をコードする配列を含んでいる。

(配列番号 5 1) 5'-GGCAAGCTTAAATTCCTGTGAATTAGCTGA-3'

(配列番号 5 2) 5'-CGGCCGTGCTGTTCTCCCCGTTTGCCGTTGCCACAGGTGCGGCC-3'

<配列表フリーテキスト>

配列番号 5 1、5 2 : 融合ブレプロセリンプロテアーゼ遺伝子構築のための PCR プライマー

次に、それぞれ増幅させた SAMP45 の N 末端プロ構造、成熟 SAMP45、そして C 末端プロ構造を含む遺伝子をコードする領域の PCR 反応液各々 1 μ l と、やはり増幅させた PS2 遺伝子のプロモーター領域を含む 5'-上流域と *C. ammoniagenes* の細胞表層タンパク質 SlpA 遺伝子のシグナル配列を含む領域の PCR 反応液 1 μ l を混ぜて鋳型とし、配列番号 5 1 と配列番号 5 0 を用いてクロスオーバー PCR を行い、PS2 遺伝子のプロモーター領域を含む 5'-上流域と *C. ammoniagenes* の細胞表層タンパク質 SlpA のシグナル配列に接続された異種融合ブレプロセリンプロテアーゼ遺伝子断片を増幅させた。

アガロースゲル電気泳動により、約 3.9kb の増幅断片を検出した。PCR 産物を HindIII と EcoRI で消化した後、アガロースゲル電気泳動に供し、約 3.9kb の断片をアガロースゲルから回収し、前述の pVC7 の HindIII-EcoRI 部位に挿入することによ

て、それぞれpVSS1を得た。先に述べた方法に従って挿入断片の塩基配列の決定を行い、予想通りの融合遺伝子が構築されていることを確認した。

(2) *C. ammoniagenes*の細胞表層タンパク質のシグナル配列を用いてのセリンプロテアーゼの分泌

構築したプラスミドpVSS1を用いて、*C. glutamicum* ATCC13869を形質転換し、5 mg/lのクロラムフェニコールを含む上記CM2S寒天培地で生育した菌株を選択した。次に、選択したpVSS1を有する*C. glutamicum* ATCC13869を、5mg/lのクロラムフェニコールを含む上記MMTG液体培地で30℃、70時間培養した。この培養液1mlを遠心分離により培養上清と菌体に分離した。菌体は0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)に懸濁した。セリンプロテアーゼの活性測定は以下のようにして行った。0.25mMのBz-Phe-Val-Arg-pNA（バッケム社製）を含有する20mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)に、培養上清あるいは菌体懸濁液50 μ lを加え、総液量0.6mlで30℃、20分間反応させた後、50%酢酸を0.4ml加えて反応を停止させた。410nmの吸光度を測定し、遊離したpNA(p-nitroanilide)の量を算出することにより活性を決定した。なお、酵素1単位は1分間に1 μ molのpNAを遊離させる酵素量とした。その結果、培養上清にはセリンプロテアーゼの活性は検出されず、菌体懸濁液に活性を検出することができた。検出された活性値と文献 [J. Bacteriol., 179, 430-438(1997)]による比活性値から計算した結果、約9mg/l相当のセリンプロテアーゼが菌体表面に分泌発現していることが確認された。

(3) *C. glutamicum* ATCC13869において分泌発現されたセリンプロテアーゼによるプロ構造部付きトランスグルタミナーゼのプロ構造部の切断

構築したプラスミドpVSS1を用いて、実施例4(2)に記載したプロ構造部付きトランスグルタミナーゼの分泌発現プラスミドpPKSPTG1を有する*C. glutamicum* AT

CC13869を形質転換し、5mg/lのクロラムフェニコールと25mg/lのカナマイシンを含む上記CM2S寒天培地で生育した菌株を選択した。次に、選択したpVSS1及びpPKSPTG1を有する*C. glutamicum* ATCC13869を、5mg/lのクロラムフェニコールと25mg/lのカナマイシンを含む上記MMTG液体培地で30℃、70時間培養した。培養終了後10 μ lの培養上清をSDS-PAGEに供してから、前述の抗トランスグルタミナーゼ抗体を用いて、常法に従って、ウエスタンブロット解析を行った。その結果SAMP45が正常に分泌発現し、やはり分泌されているプロ構造部付きトランスグルタミナーゼのプロ構造部が切断され、天然型の成熟トランスグルタミナーゼとほぼ同じ分子量を有するトランスグルタミナーゼの分泌が認められた。

この培養上清について前述のハイドロキサメート法にてトランスグルタミナーゼ活性を確認したところ、天然型とほぼ同じ比活性（約20U/mg）を有する事が確認できた。

また、SDS-PAGE後、先に述べた方法に従って、PVDF膜にセミドライブロットティングした。ブロットティング後、PVDF膜をクマシーブリリアントブルーで染色し、脱染、風乾した。成熟トランスグルタミナーゼの部分を切り取り、プロテインシークエンサーでN末端アミノ酸配列の解析を行った。その結果、配列番号5に示した*S. mobaraense*由来の天然型の成熟トランスグルタミナーゼにプロ構造部のC末端側アミノ酸のPhe-Arg-Ala-Proの4つのアミノ酸が付与されている構造であることが確認された。

実施例9：プロリン特異的ペプチダーゼ(svPEP)遺伝子のクローン化と発現プラスミド作製評価

(1) *S. mobaraense* IF013819の生産するプロリン特異的ペプチダーゼ(svPEP)の精製

ISP2液体培地（酵母エキストラクト 4g、マルトエキストラクト 10g、グルコ

ース 4g、水で1LにしてpH7.3に調整)を5L坂口フラスコに800mL張り込み、*S. mobaraense* IF013819株をプレートより植菌して30°Cで48時間、120rpmで振盪培養した。

培養液を遠心分離し、培養上清を除いて菌体を回収した。25mg/Lのカナマイシンを含む20mMトリス-塩酸緩衝液で洗浄後、得られた菌体を25mg/Lのカナマイシンを含む0.1M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0) に懸濁した。氷上で4時間振盪後、遠心分離により得られた上清を回収した。ニトロセルロースフィルター (ポアサイズ0.22 μ m、ザルトリウス社製) を用いて濾過滅菌後、FPLC (Amersham Pharmacia社製) を用いて1.5M硫酸アンモニウム / 50mMリン酸緩衝液 (pH7.0) で平衡化したButyl-Sepharose 4FF (Amersham Pharmacia社製) のカラム (1.6 ϕ ×10cm) に通し、同緩衝液中、硫酸アンモニウム1.5-0 Mの直線濃度勾配で溶出した。活性成分を含有する画分を回収し、さらに同条件でPhenyl-Sepharose HPカラム (1mL、Amersham Pharmacia社製) に通し、活性画分を回収し、50mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0) に対して一晩、4°Cで透析した。これにより、部分精製酵素液を得た。

上記各段階における総タンパク質量、総活性、比活性、収率および精製度を表4に示す。なお、各段階での酵素活性の測定は芳本らの方法 (鶴・船津編; 生物化学実験法31 蛋白質分解酵素 II, 学会出版センター(1993), p187) に従って以下のように行った。

0.25mMのAla-Ala-Pro-pNA (バッケム社製) を含有する20mMリン酸ナトリウム緩衝液に酵素溶液を加え、総液量0.6mlで30°C、5分間反応させた後、50%酢酸を0.4ml加えて反応を停止させた。410nmの吸光度を測定し、遊離したpNAの量を算出することにより活性を決定した。なお、酵素1単位は1分間に1 μ molのpNAを遊離させる酵素量とした。

表4. *S. mobaraense*由来プロリン特異的ペプチダーゼの精製

精製ステップ	容量(ml)	総活性 (単位)	総タンパク質 (mg)	比活性 (単位 /mg)	収率(%)	精製度 (倍)
粗酵素抽出液	550	308	385	0.80	100	1
フエルセファールS4F	45.6	213	8.98	23.7	69	30
F						
フエルセファールHP	5.8	136	3.83	35.5	44	44

(2) *S. mobaraense* IF013819の生産するプロリン特異的ペプチダーゼ(svPEP)

のN末端アミノ酸配列解析

部分精製酵素液を逆相クロマトグラフィーにかけてさらに純化精製した。逆相クロマトグラフィーの条件は以下の通りである。

HPLC装置： ポンプ：HITACHI L-6300、検出器：L-4000H

カラム：PROTEIN C4 214TP5410 (VYDAC社製)

溶出条件：24-40% アセトニトリル 直線勾配 / 0.1% トリフルオロ酢酸

(20min) 室温にて溶出

流速：1.0ml / min.

検出波長：280nm

上記条件で純化した酵素試料をメンブランカートリッジ(パーキンエルマー社製)を用いてPolyvinylidene-difluoride(PVDF)膜に転写し、気相プロテインシーケンサーPPSQ-10(島津製作所製)にてN末端アミノ酸配列を解析した。その結果、配列番号53に示した20残基のN末端アミノ酸部分配列が得られた。

(配列番号53) Gln Ala Asp Ile Lys Asp Arg Ile leu Lys Ile Pro

1

5

10

Gly Met Lys Phe Val Glu Glu Lys

15

20

(3) *S. mobaraense* IF013819の生産するプロリン特異的ペプチダーゼ(svPEP)の特性評価

以下の特性について*S. mobaraense* IF013819の生産するプロリン特異的ペプチダーゼを評価した。

(i)基質特異性

(a)発色基pNA付加ペプチドを基質とした場合:pNAを付加した種々のペプチド各0.25mmolを含有する20mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH6.5)に精製酵素液を加え、総量0.6mlで37°C、5分間反応させた。50%酢酸0.4mlを加えて反応を停止させ、410nmの吸光度を測定して切断活性を求めた。

(b)発色基 β NA(β -ナフチルアミド)付加ペプチドを基質とした場合:0.3mmolの各ペプチドを含有する20mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH6.5)に精製酵素液を加え、総量1.0mlで37°C、5分間反応させた。Fast garnet GBC溶液(10% Triton X-100/1M 酢酸ナトリウム(pH4.0)で溶解し、0.1%としたもの)を0.4ml添加して反応を停止させ、550nmの吸光度を測定して切断活性を求めた。

(c)ペプチドを基質とした場合:1mg / mlに調製したペプチド溶液を基質とし、酵素溶液を添加して30°C、1時間反応させた。以下の条件のHPLCにて切断活性を確認した。

カラム : YMC-PACK ODS-A 4.6×150mm (ワイエムシィ)

溶出液 : 0.1% トリフルオロ酢酸(TFA) -アセトニトリル

流速 : 1ml / min

検出波長: UV 220nm

その結果、本酵素は、プロリンのカルボキシル側を特異的に切断する酵素であって、Ala-Ala-Pro-pNA、Phe-Arg-Ala-Xaa（配列番号 68）（式中XaaはPro-pNAであり、pNAはp-ニトロアニリドを表す）、Ala-Phe-Pro-pNAの順によく認識し、N末端から3番目あるいは4番目にプロリンを含有するペプチドに強い反応性を示すことが明らかになった。また、N末端から2番目あるいは5番目にプロリンを有するペプチドには作用しないということがわかった（表5）。

表5．svPEPの特異性

ペプチド基質	相対活性 (%)
P-pNA	0.04
DP-pNA	0.00
Z-GP-βNA	0.04
GP-βNA	0.40
AP-pNA	0.53
RP-pNA	0.94
Z-AGP-βNA	0.78
Z-GAP-βNA	1.2
Bz-FVR-pNA	0.002
AAF-pNA	4.1
AAA-pNA	8.5
AFP-pNA	26.3
AAP-pNA	100
AAPL-pNA	0.3
FRAP-pNA	49.0
Suc-AAPF-pNA	0.01
SFRAP-pNA	1.23
PSFRAP-pNA	0.2

pNA：p-ニトロアニリド、βNA：β-ナフチルアミド

<配列表フリーテキスト>

配列番号 68：svPEP用基質

(ii) 至適pH

pH4~6 : 20mM 酢酸ナトリウム緩衝液

pH5.5~8 : 20mM リン酸ナトリウム緩衝液

pH6.5~9.5 : 20mM トリス-塩酸緩衝液

を各々使用し、Ala-Ala-Pro-pNAを基質として30°C、5分間反応させた。20mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH6.5における活性を100%として各緩衝液を用いた場合の相対活性を算出した。その結果、至適pHは6~6.5であることが明らかになった。

(iii) pH安定性

pH3から10までの0.15M GTA緩衝液 (3,3-ジメチルグルタル酸、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン、2-アミノ-2-メチル-1,3-プロパンジオールによる緩衝液) を使用し、精製酵素溶液20 μ lに各pHの緩衝液を40 μ l加え、4°Cで一晩放置した後、pHを7.0に調整し、液量を120 μ lに合わせた。そのうち50 μ lを使用してAla-Ala-Pro-pNAを加え30°Cで5分間反応させた。pH7.0である以外は上記と同じ条件で保存した場合の活性を100%として各pHでの相対基質分解量を残存活性とした。その結果、pH4~9の範囲で安定であることが示された。

(iv) 至適温度

精製酵素液50 μ lに20mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.5) を0.5ml加え、Ala-Ala-Pro-pNAを0.25mMになるように加えて20°Cから60°Cで5分間分解した。25°Cにおける基質分解量を100%とした場合の各温度での相対分解量を相対活性とした。その結果、至適温度は25~30°Cであることが示された。

(v) 温度安定性

精製酵素液50 μ lに20mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.5) を0.5ml加え、4°Cまたは20°Cから60°Cで15分間処理した後、氷冷し、Ala-Ala-Pro-pNAを0.25mMとなるように加えて、30°Cで5分間反応させた。上記で4°Cで処理した場合の活性を100%として残存活性を算出した。その結果、20°C以下で安定であるということが示さ

れた。

(vi)阻害剤

各種化合物を第6表に示した濃度で含有する20mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) に精製酵素溶液を加え、室温で10分間放置した。その後Ala-Ala-Pro-pNAを加えて30°Cで5分間反応させた。化合物無添加の場合のAla-Ala-Pro-pNAに対する活性を100%として、各種化合物添加の場合の相対基質分解量を相対活性とした。その結果、SH酵素阻害剤であるp-クロロメルクリ安息香酸等によっても若干の阻害を受けたが、セリンプロテアーゼ阻害剤であるフェニルメチルスルフォニルフルオリド (ナカライテスク社製) およびアミノエチルベンゼンスルフォニルフルオリド・ハイドロクロライド (ベーリンガー・マンハイム社製) にて比較的強い阻害作用を受けた。

表6. *S. mobaraense*由来のプロリン特異的ペプチダーゼ活性への阻害剤の影響

化 合 物	濃度 (mM)	相対活性(%)
阻害剤無添加	0	100
セリン酵素阻害剤		
フェニルメチルスルフォニルフルオリド	1	39.7
アミノエチルベンゼンスルフォニルフルオリド・ハイドロクロライド	4	59.9
キモスタチン	1	84.9
SH-酵素阻害剤		
p-クロロメルクリ安息香酸	1	87.1
N-エチルマレイミド	1	98.3
ヨードアセトアミド	1	87
ロイペプチン	0.5	79.6
アスパラギン酵素阻害剤		
ペプスタチン	1	165.7
メタロプロテアーゼ阻害剤		
EDTA	10	105.2
1,10-フェナンスロリン	1	92.5
アミノペプチダーゼ阻害剤		
ペプスタチン	1	97.6
還元剤		
ジチオスレイトール	10	102.5
プロリルエンドペプチダーゼ阻害剤		
Z-(S)Pro-(S)Prolinal	1	111.2
Z-Pro-(S)Prolinal	1	105.8
Z-Pro-Prolinal	1	99.7

(3) *S. mobaraense* IF013819由来プロリン特異的ペプチダーゼ(svPEP)遺伝子の取得

決定したsvPEPのN末端20アミノ酸配列から推定される塩基配列中で縮重の少ない部位Lys-Ile-Pro-Gly-Met-Lys-Phe-Val-Glu-Glu-Lysを選び配列番号54に示した合成オリゴヌクレオチドを作製した。この合成オリゴヌクレオチドをプローブとして、常法に従って調製した*S. mobaraense* IF013819の染色体DNAを、6塩基配

列を認識する種々の制限酵素で消化し、サザンブロットハイブリダイゼーション法により解析したところ、SacI切断により約6kbの単一バンドが検出された。そこで、先の方法により調製した*S. mobaraense* IF013819の染色体DNAをSacIで消化し、約6kbの断片をEASYTRAP Ver.2（宝酒造社製）を用いてアガロースゲル電気泳動により回収した。回収断片をpUC18のSacI部位に挿入した後、*Escherichia coli* JM 109（宝酒造社製）のコンピテントセルに導入し、ライブラリーを作製した。作製したライブラリーを、配列番号54に示した合成オリゴヌクレオチドの³²Pラベル化物をプローブとしてコロニーハイブリダイゼーションにより、ライブラリーのスクリーニングを行い、svPEP遺伝子断片がクローン化されたプラスミドを保持する菌株をスクリーニングし、目的とする遺伝子を取得した。この菌株より回収したプラスミドをpUMP1と名付けた。

（配列番号54）5'-AAGATCCCCGGGATGAAGTTCGTCGAGGAGAAG-3'

<配列表フリーテキスト>

配列番号 54：svPEP用のプローブ

pUMP1としてクローン化した断片の塩基配列を決定した。svPEPに対応するsvPEP遺伝子配列を配列番号 41 に示した。この遺伝子にコードされるアミノ酸配列を推定したところ、先に精製酵素タンパク質より決定したN末端部分アミノ酸配列(20残基)を見出し、配列番号 40 に示した成熟型svPEPのアミノ酸一次配列を決定した。また、配列番号 42 に示したようなsvPEPのシグナル配列およびプロ構造と想定される領域を含む全アミノ酸の一次配列を決定した。

pUMP1で形質転換した*Escherichia coli* AJ13691を FERM BP-7160として、2000年5月15日付けでブダベスト条約に基づき通商産業省・工業技術院生命工学工業技術研究所(日本国 〒305-8566 茨城県つくば市東1丁目1-3)に寄託してある。

(4) *C. ammoniagenes*の細胞表層タンパク質のシグナル配列を有するプロ構造部付きプロリン特異的ペプチダーゼ(svPEP)遺伝子(異種融合プレプロプロリン特異的ペプチダーゼ(svPEP)遺伝子)の構築

実施例9(3)で決定したsvPEPの配列を参考にして、実施例9(3)で構築したpUM P1を鋳型として、配列番号55と配列番号56に示したプライマーを合成し、svPEPのプロ構造、そして成熟svPEPを含む遺伝子領域をこれまでと同じ方法でPCR法にて増幅した。

(配列番号55) 5'-GAGGCGGCGTCGATCACCGCCCC-3'

(配列番号56) 5'-GCCAAGCTTGAAGCACCGGCGGCGGCACCCGG-3'

<配列表フリーテキスト>

配列番号55、56：PCRプライマー

次に、実施例4(2)で構築したpPKSPTG1を鋳型として、配列番号51と配列番号57の組み合わせにより、*C. glutamicum*の細胞表層タンパク質であるPS2遺伝子のプロモーター領域を含む5'-上流域と*C. ammoniagenes*の細胞表層タンパク質SlpA遺伝子のシグナル配列を含む領域をPCR法にて増幅した。

配列番号57に示したプライマーはプロ構造部付きsvPEPとの融合遺伝子を構築するために、svPEPのN末端側のアミノ酸をコードする配列を含んでいる。

(配列番号51) 5'-GGCAAGCTTAAATTCCTGTGAATTAGCTGA-3'

(配列番号57) 5'-GGGGCGGTGATCGACGCCGCTCTGCCGTTGCCACAGGTGCGGCCA-3'

<配列表フリーテキスト>

配列番号57：PCRプライマー

次に、それぞれ増幅させたsvPEPのプロ構造、そして成熟svPEPを含む遺伝子を

コードする領域のPCR反応液各々1 μ lと、やはり増幅させたPS2遺伝子のプロモーター領域を含む5'-上流域と*C. ammoniagenes*の細胞表層タンパク質SlpAのシグナル配列を含む領域のPCR反応液1 μ lを混ぜて鋳型とし、配列番号51と配列番号56を用いてクロスオーバーPCRを行い、PS2遺伝子のプロモーター領域を含む5'-上流域と*C. ammoniagenes*の細胞表層タンパク質SlpAのシグナル配列に接続された異種融合プレプロsvPEP遺伝子断片を増幅させた。

(配列番号51) 5'-GGCAAGCTTAAATTCCTGTGAATTAGCTGA-3'

(配列番号56) 5'-GCCAAGCTTGAAGCACCGGCGGCGGCACCCGG-3'

アガロースゲル電気泳動により、約2.1kbの増幅断片を検出した。PCR産物をHindIIIで消化した後、アガロースゲル電気泳動に供し、約2.1kbの断片をアガロースゲルから回収し、実施例8(1)記載のpVSS1のHindIII部位に挿入することによって、それぞれpVSSSP1を得た。常法に従って、挿入断片の塩基配列の決定を行い、予想通りの融合遺伝子が構築されていることを確認した。

(5)*C. ammoniagenes*の細胞表層タンパク質のシグナル配列を用いてのプロリン特異的ペプチダーゼの分泌

構築したプラスミドpVSSSP1を用いて、*C. glutamicum* ATCC13869を形質転換し、5mg/lのクロラムフェニコールを含む上記CM2S寒天培地で生育した菌株を選択した。次に、選択したpVSSSP1を有する*C. glutamicum* ATCC13869を、5mg/lのクロラムフェニコールを含む上記MMTG液体培地で30°C、70時間培養した。この培養液1mlを遠心分離により培養上清と菌体に分離した。菌体は0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)に懸濁した。svPEPの活性測定は以下のようにして行った。0.25mMのAla-Ala-Pro-pNA (バクケム社製) を含有する20mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)に、培養上清あるいは菌体懸濁液50 μ lを加え、総液量0.6mlで30°C、20分間反応させた後、50%酢酸を0.4ml加えて反応を停止させた。410nmの吸光度を測定し、

遊離したpNAの量を算出することにより活性を決定した。なお、酵素1単位は1分間に1 μ molのpNAを遊離させる酵素量とした。その結果、培養上清にはsvPEPの活性は検出されず、菌体懸濁液に活性を検出することができた。検出された活性値と実施例9(1)による比活性値から計算した結果、約50mg/l相当のsvPEPが菌体表面に分泌発現していることが確認された。

(6) *C. glutamicum* ATCC13869において分泌発現されたセリンプロテアーゼとプロリン特異的ペプチダーゼによるプロ構造部付きトランスグルタミナーゼのプロ構造部の切断

構築したプラスミドpVSSSP1を用いて、実施例4(2)に記載したプロ構造部付きトランスグルタミナーゼの分泌発現プラスミドpPKSPTG1を有する*C. glutamicum* ATCC13869を形質転換し、5mg/lのクロラムフェニコールと25mg/lのカナマイシンを含む上記CM2S寒天培地で生育した菌株を選択した。次に、選択したpVSSSP1及びpPKSPTG1を有する*C. glutamicum* ATCC13869を、5mg/lのクロラムフェニコールと25mg/lのカナマイシンを含む上記MMTG液体培地で30℃、70時間培養した。培養終了後10 μ lの培養上清をSDS-PAGEに供してから、前述の抗トランスグルタミナーゼ抗体を用いて、常法に従って、ウエスタンブロット解析を行った。その結果SAMP45およびsvPEPが正常に分泌発現し、やはり分泌されているプロ構造部付きトランスグルタミナーゼのプロ構造部が切断され、天然型の成熟トランスグルタミナーゼとほぼ同じ分子量を有するトランスグルタミナーゼの分泌が認められた。

この培養上清について前述のヒドロキサメート法にてトランスグルタミナーゼ活性を確認したところ、天然型とほぼ同じ比活性（約20U/mg）を有する事が確認できた。

また、SDS-PAGE後、前述の方法に従って、PVDF膜にセミドライブロットティングした。ブロットティング後、PVDF膜をクマシーブリリアントブルーで染色し、脱染、

風乾した。成熟トランスグルタミナーゼの部分を切り取り、プロテインシークエンサーでN末端アミノ酸配列の解析を行った。その結果、配列番号5に示した*S. mobaraense*由来の天然型の成熟トランスグルタミナーゼと同一の、AspをN末端のアミノ酸として有する配列を取っていることが確認された。

実施例10 : *S. mobaraense* IF013819由来のプロトランスグルタミナーゼのプロ構造部の部分欠失体作製とトランスグルタミナーゼの分泌生産

(1) プロ構造部の部分欠失型トランスグルタミナーゼ遺伝子の構築

先ずプロ構造部のC末端側のアミノ酸残基の部分欠失型を作製するために、実施例1(1)で決定したトランスグルタミナーゼの遺伝子配列をもとに配列番号8と配列番号9に示したプライマーを合成し、実施例1(1)で取得したpUITGから成熟トランスグルタミナーゼの遺伝子領域をこれまでと同じPCR法にて増幅した。

次に、実施例4(2)で構築したpPKSPTG1を鋳型として、配列番号14と配列番号58、あるいは配列番号14と配列番号59の組み合わせにより、*C. glutamicum*の細胞表層タンパク質であるPS2遺伝子のプロモーターを含む5'-上流域と*C. ammoniagenes*の細胞表層タンパク質SlpAのシグナル配列、及びトランスグルタミナーゼのプロ構造部を含む遺伝子領域をPCR法にて増幅した。

配列番号58に示したプライマーは、トランスグルタミナーゼのプロ構造部のC末端アミノ酸2残基の配列Ala-Proを欠失、配列番号59に示したプライマーはC末端アミノ酸4残基の配列Phe-Arg-Ala-Proを欠失した遺伝子配列を有しており、さらに成熟トランスグルタミナーゼとの融合遺伝子を構築するために、成熟トランスグルタミナーゼのN末端側のアミノ酸をコードする配列を含んでいる。

(配列番号14) 5'-AAATTCCTGTGAATTAGCTGATTAG-3'

(配列番号58) 5'-GTG ACC CTG TCG TCG GAG TCC CGG AAC GAC GGG CCG GCG C-3'

(配列番号 59) 5'-GTG ACC CTG TCG TCG GAG TCC GAC GGG CCG GCG CTC GAA G-3'

<配列表フリーテキスト>

配列番号 58, 59 : PCRプライマー

それぞれ増幅させた*C. glutamicum*の細胞表層タンパク質であるPS2遺伝子のプロモーター領域を含む5'-上流域と*C. ammoniagenes*の細胞表層タンパク質SlpAのシグナル配列、及びそれぞれの改変型のプロ構造部を含む領域をコードする遺伝子領域のPCR反応液各々1μlと、やはり増幅させた成熟トランスグルタミナーゼをコードする領域のPCR反応液1μlを混ぜて鋳型とし、配列番号14と配列番号9を用いてクロスオーバーPCRを行い、*C. glutamicum*の細胞表層タンパク質であるPS2遺伝子のプロモーター領域を含む5'-上流域と*C. ammoniagenes*の細胞表層タンパク質SlpAのシグナル配列、及びトランスグルタミナーゼの部分欠失型プロ構造部に接続された成熟トランスグルタミナーゼ遺伝子断片をそれぞれ増幅させた。

(配列番号 14) 5'-AAATTCCTGTGAATTAGCTGATTTAG-3'

(配列番号 9) 5'-CGCTCACATCACGGCCAGCCCTGCTTTACC-3'

アガロースゲル電気泳動により、約1.8kbのそれぞれの増幅断片を検出した。これらの断片を制限酵素ScaI及びEco065Iで消化することにより生じる約800bpの断片をアガロースゲルから回収し、実施例4(2)で構築したpPKSPTG1の、ScaIとEco065Iで切り出される断片と入れ替えることによりpPKSPTG1ΔAP(Ala-Pro欠失型)及びpPKSPTG1ΔFRAP(Phe-Arg-Ala-Pro欠失型)を構築した。

次にプロ構造部のN末端側のアミノ酸残基の部分欠失型を作製するために、実施例1(1)で決定したトランスグルタミナーゼの遺伝子配列をもとに配列番号60と配列番号61に示したプライマーを合成し、配列番号60と配列番号9、あ

るいは配列番号 6 1 と配列番号 9 の組み合わせで実施例 1 (1) で取得した pUIT G からプロトランスグルタミナーゼの遺伝子領域を PCR 法にて増幅した。

(配列番号 6 0) 5'-AAT GGC GCG GGG GAA GAG ACG AAG TCC TAC GCC GAA ACC T-3'

(配列番号 6 1) 5'-GAG ACG AAG TCC TAC GCC GAA ACC TAC CGC CTC ACG GCG G-3'

(配列番号 9) 5'-CGCTCACATCACGGCCAGCCCTGCTTTACC-3'

<配列表フリーテキスト>

配列番号 6 0, 6 1 : PCRプライマー

次に、実施例 4(2) で構築した pPKSPTG1 を鋳型として、配列番号 1 4 と配列番号 6 2、あるいは配列番号 1 4 と配列番号 63 の組み合わせにより、*C. glutamicum* の細胞表層タンパク質である PS2 遺伝子のプロモーター領域を含む 5'-上流域と *C. ammoniagenes* の細胞表層タンパク質 SlpA のシグナル配列を含む領域を PCR 法にて増幅した。

配列番号 6 2 に示したプライマーは、トランスグルタミナーゼのプロ構造部の N 末端アミノ酸 1 残基目の Asp を欠失、また配列番号 6 3 に示したプライマーは N 末端アミノ酸 6 残基の配列 Asp-Asn-Gly-Ala-Gly-Glu を欠失した遺伝子配列を有しており、さらに *C. ammoniagenes* の細胞表層タンパク質 SlpA のシグナル配列との融合遺伝子を構築するために、*C. ammoniagenes* の細胞表層タンパク質 SlpA のシグナル配列の C 末端側のアミノ酸をコードする配列を含んでいる。

(配列番号 1 4) 5'-AAATTCCTGTGAATTAGCTGATTTAG-3'

(配列番号 6 2) 5'-GTC TCT TCC CCC GCG CCA TTT GCC GTT GCC ACA GGT GCG G-3'

(配列番号 6 3) 5'-TCG GCG TAG GAC TTC GTC TCT GCC GTT GCC ACA GGT GCG G-

3'

<配列表フリーテキスト>

配列番号 62, 63 : PCRプライマー

それぞれ増幅させた*C. glutamicum*の細胞表層タンパク質であるPS2遺伝子のプロモーター領域を含む5'-上流域と*C. ammoniagenes*の細胞表層タンパク質SlpAのシグナル配列を含む領域をコードする遺伝子領域のPCR反応液各々1 μ lと、やはり増幅させたプロ構造部のN末端を部分欠失したプロトランスグルタミナーゼをコードする領域のPCR反応液1 μ lを混ぜて鋳型とし、配列番号14と配列番号9を用いてクロスオーバーPCRを行い、*C. glutamicum*の細胞表層タンパク質であるPS2遺伝子のプロモーター領域を含む5'-上流域と*C. ammoniagenes*の細胞表層タンパク質SlpAのシグナル配列、及びトランスグルタミナーゼの部分欠失型プロ構造部に接続された成熟トランスグルタミナーゼ遺伝子断片を増幅させた。

(配列番号14) 5'-AAATTCCTGTGAATTAGCTGATTAG-3'

(配列番号9) 5'-CGCTCACATCACGGCCAGCCCTGCTTTACC-3'

アガロースゲル電気泳動により、約1.8kbのそれぞれの増幅断片を検出した。これらの断片を制限酵素ScaI及びEco065Iで消化することにより生じる約800bpの断片をアガロースゲルから回収し、実施例4(2)で構築したpPKSPTG1の、ScaIとEco065Iで切り出される断片と入れ替えることによりpPKSPTG1 Δ D(Asp欠失型)及びpPKSPTG1 Δ DNGAGE(Asp-Asn-Gly-Ala-Gly-Glu欠失型)を構築した。

(2) プロ構造部分欠失型トランスグルタミナーゼの分泌

構築したプラスミドpPKSPTG1 Δ AP、pPKSPTG1 Δ FRAP、pPKSPTG1 Δ D、あるいはpPKSPTG1 Δ DNGAGEを用いて*C. glutamicum* ATCC13869を形質転換し、25mg/lのカナマイシンを含む上記CM2S寒天培地で生育した菌株を選択した。次に、選択したpP

KSPTG1 Δ AP、pPKSPTG1 Δ FRAP、pPKSPTG1 Δ D、あるいはpPKSPTG1 Δ DNGAGEを有する *C. glutamicum* ATCC13869を25mg/lのカナマイシンを含む上記MMTG液体培地でそれぞれ30°C、48時間培養した。培養終了後10 μ lの培養上清をSDS-PAGEに供してから、前述の抗トランスグルタミナーゼ抗体を用いて、常法に従って、ウエスタンブロット解析を行った。その結果、プロ構造部が部分的に欠失したプロトランスグルタミナーゼの分泌が確認された。pPKSPTG1 Δ AP、pPKSPTG1 Δ FRAP、およびpPKSPTG1 Δ Dを保持する組換え体はそれぞれ天然型(pPKSPTG1)と同等の分泌性を示したが、pPKSPTG1 Δ DNGAGEを保持する組換え体については天然型(pPKSPTG1)のその約1/2の分泌量であった。

(3) *C. glutamicum* ATCC13869において分泌発現されたセリンプロテアーゼによるプロ構造部分欠失型プロトランスグルタミナーゼのプロ構造部の切断

実施例8(1)で構築したプラスミドpVSS1を用いて、実施例10(2)に記載したプロ構造部分欠失型プロトランスグルタミナーゼの分泌発現プラスミドpPKSPTG1 Δ AP、pPKSPTG1 Δ FRAP、pPKSPTG1 Δ DおよびpPKSPTG1 Δ DNGAGEを有する *C. glutamicum* ATCC13869を形質転換し、5mg/lのクロラムフェニコールと25mg/lのカナマイシンを含む上記CM2S寒天培地で生育した菌株を選択した。次に、選択したpVSS1とpPKSPTG1 Δ AP、pPKSPTG1 Δ FRAP、pPKSPTG1 Δ DおよびpPKSPTG1 Δ DNGAGEを有する *C. glutamicum* ATCC13869を5mg/lのクロラムフェニコールと25mg/lのカナマイシンを含む上記MMTG液体培地で30°C、70時間培養した。培養終了後10 μ lの培養上清をSDS-PAGEに供してから、前述の抗トランスグルタミナーゼ抗体を用いて、常法に従って、ウエスタンブロット解析を行った。

その結果SAMP45が正常に分泌発現し、やはり分泌されているプロ構造部分欠失型プロトランスグルタミナーゼのプロ構造部が切断され、天然型の成熟トランスグルタミナーゼとほぼ同じ分子量を有するトランスグルタミナーゼの分泌が認められた。

また、SDS-PAGE後、先に述べたと同じ方法でPVDF膜にセミドライプロットイングした。プロットイング後、PVDF膜をクマシーブリリアントブルーで染色し、脱染、風乾した。成熟トランスグルタミナーゼの部分を切り取り、プロテインシークエンサーでN末端アミノ酸配列の解析を行った。その結果、pPKSPTG1 Δ APを有する組換え体では配列番号5に示した天然型の成熟トランスグルタミナーゼのN末端にPhe-Argが付加したものが、pPKSPTG1 Δ FRAPを有する組換え体では成熟トランスグルタミナーゼのN末端にSer-Ala-Gly-Pro-Serが付加したものが、pPKSPTG1 Δ DおよびpPKSPTG1 Δ DNGAGEを有する組換え体では成熟トランスグルタミナーゼにPhe-Arg-Ala-Proが付加していることが確認された。

実施例11：S. mobaraense IF013819由来のプロトランスグルタミナーゼのプロ構造部の改変体作製とトランスグルタミナーゼの分泌生産

(1) プロ構造部改変型プロトランスグルタミナーゼ遺伝子の構築

実施例1(1)で決定したトランスグルタミナーゼの遺伝子配列をもとに配列番号8と配列番号9に示したプライマーを合成し、実施例1(1)で取得したpUITGから成熟トランスグルタミナーゼの遺伝子領域をPCR法にて増幅した。

次に、実施例4(2)で構築したpPKSPTG1を鋳型として、配列番号14と配列番号64の組み合わせ、あるいは配列番号14と配列番号65の組み合わせ、あるいは配列番号14と配列番号66の組み合わせ、あるいは配列番号14と配列番号67の組み合わせにより、C. glutamicumの細胞表層タンパク質であるPS2遺伝子のプロモーター領域を含む5'-上流域とC. ammoniagenesの細胞表層タンパク質SlpAのシグナル配列、及びトランスグルタミナーゼのプロ構造部を含む領域をPCR法にて増幅した。

配列番号64に示したプライマーは、トランスグルタミナーゼのプロ構造部のC末端アミノ酸3残基の配列Arg-Ala-ProをGly-Pro-Lysに、配列番号65に示したプ

ライマーはArg-Ala-ProをGly-Pro-Argに変換した遺伝子配列を有している。また配列番号66に示したプライマーは、プロ構造部のC末端アミノ酸5残基の配列Ser-Phe-Arg-Ala-ProからLysのみに、配列番号67に示したプライマーは、Ser-Phe-Arg-Ala-ProからArgのみに変換した遺伝子配列を有している。

さらに成熟トランスグルタミナーゼとの融合遺伝子を構築するために、成熟トランスグルタミナーゼのN末端側のアミノ酸をコードする配列を含んでいる。

(配列番号14) 5'-AAATTCCTGTGAATTAGCTGATTAG-3'

(配列番号64) 5'-GTG ACC CTG TCG TCG GAG TCC TTG GGG CCG AAC GAC GGG C-3'

(配列番号65) 5'-GTG ACC CTG TCG TCG GAG TCG CGG GGG CCG AAC GAC GGG C-3'

(配列番号66) 5'-GTG ACC CTG TCG TCG GAG TCC TTC GGG CCG GCG CTC GAA G-3'

(配列番号67) 5'-GTG ACC CTG TCG TCG GAG TCG CGC GGG CCG GCG CTC GAA G-3'

<配列表フリーテキスト>

配列番号64～67: PCRプライマー

それぞれ増幅させた*C. glutamicum*の細胞表層タンパク質であるPS2遺伝子のプロモーター領域を含む5'-上流域と*C. ammoniagenes*の細胞表層タンパク質SlpAのシグナル配列、及び改変型プロ構造部を含む領域をコードする遺伝子領域のPCR反応液各々1 μ lと、やはり増幅させた成熟トランスグルタミナーゼをコードする領域のPCR反応液1 μ lを混ぜて鋳型とし、配列番号14と配列番号9を用いてクローソオーバーPCRを行い、*C. glutamicum*の細胞表層タンパク質であるPS2遺伝子のプロモーター領域を含む5'-上流域と*C. ammoniagenes*の細胞表層タンパク質SlpAの

シグナル配列、及び改変型トランスグルタミナーゼのプロ構造部に接続された成熟トランスグルタミナーゼ遺伝子断片を増幅させた。

(配列番号 14) 5'-AAATTCCTGTGAATTAGCTGATTTAG-3'

(配列番号 9) 5'-CGCTCACATCACGGCCAGCCCTGCTTTACC-3'

アガロースゲル電気泳動により、約1.8kbの増幅断片を検出した。この断片を制限酵素ScaI及びEco065Iで消化することにより生じる約800bpの断片をアガロースゲルから回収し、実施例4(2)で構築したpPKSPTG1の、ScaIとEco065Iで切り出される断片と入れ替えることによりpPKSPTG11(Gly-Pro-Lys改変型)及びpPKSPTG12(Gly-Pro-Arg改変型)、pPKSPTG13(Δ phe-Arg-Ala-ProでLys挿入改変型)及びpPKSPTG14(Δ phe-Arg-Ala-ProでArg挿入改変型)を構築した。

(2) プロ構造改変型トランスグルタミナーゼの分泌

構築したプラスミドpPKSPTG11、pPKSPTG12、pPKSPTG13あるいはpPKSPTG14を用いて*C. glutamicum* ATCC13869を形質転換し、25mg/lのカナマイシンを含む上記CMTS寒天培地で生育した菌株を選択した。次に、選択したpPKSPTG11、pPKSPTG12、pPKSPTG13あるいはpPKSPTG14を有する*C. glutamicum* ATCC13869を、25mg/lのカナマイシンを含む上記MTG液体培地でそれぞれ30°C、48時間培養した。培養終了後10 μ lの培養上清をSDS-PAGEに供してから、前述の抗トランスグルタミナーゼ抗体を用いて、常法に従って、ウエスタンブロット解析を行った。その結果、プロ構造部付きトランスグルタミナーゼの分泌が確認された。

(3) *C. glutamicum* ATCC13869において分泌発現されたセリンプロテアーゼによる改変型プロ構造部付きトランスグルタミナーゼのプロ構造部の切断

実施例8(1)で構築したプラスミドpVSS1を用いて、実施例11(2)に記載した改変型プロ構造部付きトランスグルタミナーゼの分泌発現プラスミドpPKSPTG11、pPKSPTG12、pPKSPTG13あるいはpPKSPTG14を*C. glutamicum* ATCC13869に形質転換

し、5mg/lのクロラムフェニコールと25mg/lのカナマイシンを含む上記CM2S寒天培地で生育した菌株を選択した。次に、選択したpVSS1とpPKSPTG11、あるいはpVSS1とpPKSPTG12、pVSS1とpPKSPTG13、あるいはpVSS1とpPKSPTG14を有する*C. glutamicum* ATCC13869を、5mg/lのクロラムフェニコールと25mg/lのカナマイシンを含む上記MMTG液体培地で30℃、70時間培養した。培養終了後10 μ lの培養上清をSDS-PAGEに供してから、前述の抗トランスグルタミナーゼ抗体を用いて、常法に従って、ウエスタンブロット解析を行った。その結果SAMP45が正常に分泌発現し、やはり分泌されている改変型プロ構造部付きトランスグルタミナーゼの改変型プロ構造部が切断され、天然型の成熟トランスグルタミナーゼとほぼ同じ分子量を有するトランスグルタミナーゼの分泌が認められた。

また、SDS-PAGE後、常法通りPVDF膜にセミドライブロットティングした。ブロットティング後、PVDF膜をクマシーブリリアントブルーで染色し、脱染、風乾した。成熟トランスグルタミナーゼの部分を取り取り、プロテインシークエンサーでN末端アミノ酸配列の解析を行った。その結果、pVSS1とpPKSPTG11、あるいはpVSS1とpPKSPTG12を有する*C. glutamicum* ATCC13869については配列番号5に示した天然型の成熟トランスグルタミナーゼと同一の、AspをN末端のアミノ酸として有する配列を取っていることが確認された。他方、pVSS1とpPKSPTG13、あるいはpVSS1とpPKSPTG14を有する*C. glutamicum* ATCC13869については天然型の成熟トランスグルタミナーゼにSer-Ala-Gly-Pro-Lys（配列番号69）、あるいはSer-Ala-Gly-Pro-Arg（配列番号70）の付加したものであった。

前者の天然型成熟トランスグルタミナーゼと同一のアミノ酸配列を有するものの培養上清についてハイドロキサメート法にてトランスグルタミナーゼ活性を確認したところ、天然型とほぼ同じ比活性（約20U/mg）を有する事が確認できた。

<配列表フリーテキスト>

配列番号69、70：天然のトランスグルタミナーゼに付加された配列

本発明により、コリネバクテリウム属細菌に有用タンパク質、特にトランスグルタミナーゼを多量に産生させ、かつ効率よく菌体外に分泌させることができる。本発明によって生産されるタンパク質は培地中に放出されるため、既知の適切な方法により、簡便かつ大規模に培地から直接回収することができる。

請求の範囲

1. コリネ型細菌中で機能するプロモーター配列の下流にコリネ型細菌由来のシグナルペプチド領域をコードする核酸配列が接続され、更に前記シグナルペプチド領域をコードする核酸配列の下流にプロ構造部を含む異種の分泌型タンパク質をコードする核酸配列が接続された発現遺伝子構築物を有するコリネ型細菌を培養し、前記異種の分泌型タンパク質を前記コリネ型細菌に産生および分泌させ、次いで前記異種の分泌型タンパク質からプロ構造部を切断・除去することを特徴とする、異種の分泌型タンパク質の製造方法。
2. 異種の分泌型タンパク質がトランスグルタミナーゼである請求項1記載の方法。
3. シグナルペプチドがコリネ型細菌由来の細胞表層タンパク質のシグナルペプチドである請求項1または2に記載の方法。
4. シグナルペプチドがコリネバクテリウム・グルタミカム由来の細胞表層タンパク質のシグナルペプチドである請求項1または2に記載の方法。
5. シグナルペプチドが配列番号1または29に示すアミノ酸配列を有する、請求項4記載の方法。
6. シグナルペプチドがコリネバクテリウム・アンモニアゲネス由来の細胞表層タンパク質のシグナルペプチドである請求項1または2記載の方法。
7. シグナルペプチドが配列番号2に示すアミノ酸配列を有する請求項6記載の方法。
8. プロ構造部が放線菌由来のトランスグルタミナーゼのプロ構造部に相当する請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。
9. プロ構造部が配列番号3または4に示す配列を有する、請求項8記載の方法。
10. プロ構造部が、配列番号3または4に記載のアミノ酸配列において少なくとも一つのアミノ酸の置換または欠失または挿入または付加またはこれらの組み

合わせを含む請求項 8 記載の方法。

11. プロ構造部のアミノ酸配列が配列番号 30～38 に記載のアミノ酸配列のいずれかである請求項 10 記載の方法。

12. プロ構造部の切断・除去がプロテアーゼによって行なわれる請求項 1 または 2 に記載の方法。

13. 異種の分泌型タンパク質を産生および分泌するコリネ型細菌が更にプロテアーゼを産生することを特徴とする、請求項 12 に記載の方法。

14. プロ構造部の切断・除去がプロテアーゼおよびペプチダーゼによって行われる請求項 13 に記載の方法。

15. 異種の分泌型タンパク質を産生および分泌するコリネ型細菌が更にプロテアーゼおよびペプチダーゼを産生することを特徴とする、請求項 14 に記載の方法。

16. プロテアーゼが放線菌由来である請求項 12 または 14 に記載の方法。

17. プロテアーゼがストレプトマイセス・アルボグリセオラス由来である請求項 12 または 14 に記載の方法。

18. ペプチダーゼが放線菌由来である請求項 14 に記載の方法。

19. ペプチダーゼがストレプトマイセス・モバラエンス由来である請求項 14 に記載の方法。

20. トランスグルタミナーゼが放線菌由来トランスグルタミナーゼである請求項 2～11 のいずれか 1 項に記載の方法。

21. トランスグルタミナーゼがストレプトバーチシリウム・モバラエンス由来トランスグルタミナーゼである請求項 20 に記載の方法。

22. トランスグルタミナーゼが配列番号 5 のアミノ酸配列を有する、請求項 21 に記載の方法。

23. トランスグルタミナーゼがストレプトバーチシリウム・シナモニウム由来

トランスグルタミナーゼである請求項 20 記載の方法。

24. トランスグルタミナーゼが配列番号 43 のアミノ酸配列を有する、請求項 23 に記載の方法。

25. コリネ型細菌由来のシグナルペプチドの下流に成熟型トランスグルタミナーゼが接続された融合タンパク質をコリネ型細菌に産生および分泌させることを特徴とする、成熟型トランスグルタミナーゼを分泌生産する方法。

26. 以下の性質を有するプロリン特異的ペプチダーゼ。

(1) 以下のプロリン含有ペプチドの少なくとも 1 つに対して作用し、プロリンのカルボキシル側で前記ペプチドを切断する。

Ala-Ala-Pro-pNA、Ala-Phe-Pro-pNA、Phe-Arg-Ala-Pro-pNA

(式中、pNAはp-ニトロアニリドを表す。)

(2) 至適pHが6.0～6.5である。

(3) pH4～9で安定である。

(4) 至適温度が25～30℃である。

(5) 20℃以下で安定である。

(6) フェニルメチルスルフォニルフルオリド、アミノエチルベンゼンスルフォニルフルオリド・ハイドロクロライドで活性が阻害される。

(7) 等電点が10.2である。

(8) 分子量が約50,000である。

27. 放線菌由来である請求項 26 に記載のプロリン特異的ペプチダーゼ。

28. 配列番号 40 記載のアミノ酸配列を含む請求項 26 記載のプロリン特異的ペプチダーゼ活性を有するポリペプチド。

29. 配列番号 40 記載のアミノ酸配列において少なくとも 1 個のアミノ酸の置換または欠失または挿入または付加またはこれらの組合わせを含む、請求項 26 記載のプロリン特異的ペプチダーゼ活性を有するポリペプチド。

30. 請求項28あるいは請求項29に記載されたポリペプチドをコードする核酸分子。

SEQUENCE LISTING

<110> Ajinomoto Co., Inc.

<120> A method for producing transglutaminase

<130> Y1H0862

<140>

<141>

<150> JP 11-280098

<151> 1999-09-30

<150> JP 2000-194043

<151> 2000-06-28

<160> 70

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 30

<212> PRT

<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 1

Met Phe Asn Asn Arg Ile Arg Thr Ala Ala Leu Ala Gly Ala Ile Ala

1

5

10

15

Ile Ser Thr Ala Ala Ser Gly Val Ala Ile Pro Ala Phe Ala

20

25

30

<210> 2

<211> 25

<212> PRT

<213> *Corynebacterium ammoniagenes*

<400> 2

Met Lys Arg Met Lys Ser Leu Ala Ala Ala Leu Thr Val Ala Gly Ala

1

5

10

15

Met Leu Ala Ala Pro Val Ala Thr Ala

20

25

<210> 3

<211> 45

<212> PRT

<213> *Streptoverticillium mobaraense*

<400> 3

Asp Asn Gly Ala Gly Glu Glu Thr Lys Ser Tyr Ala Glu Thr Tyr Arg

1

5

10

15

Leu Thr Ala Asp Asp Val Ala Asn Ile Asn Ala Leu Asn Glu Ser Ala

20

25

30

Pro Ala Ala Ser Ser Ala Gly Pro Ser Phe Arg Ala Pro

35

40

45

<210> 4

<211> 54

<212> PRT

<213> Streptoverticillium cinnamoneum

<400> 4

Gly Asp Gly Glu Glu Lys Gly Ser Tyr Ala Glu Thr His Gly Leu Thr

1

5

10

15

Ala Asp Asp Val Glu Ser Ile Asn Ala Leu Asn Glu Arg Ala Leu Thr

20

25

30

Leu Gly Gln Pro Gly Lys Pro Pro Lys Glu Leu Pro Pro Ser Ala Ser

35

40

45

Ala Pro Ser Arg Ala Pro

50

<210> 5

<211> 331

<212> PRT

<213> Streptoverticillium mobaraense

<400> 5

Asp Ser Asp Asp Arg Val Thr Pro Pro Ala Glu Pro Leu Asp Arg Met

1 5 10 15

Pro Asp Pro Tyr Arg Pro Ser Tyr Gly Arg Ala Glu Thr Val Val Asn

20 25 30

Asn Tyr Ile Arg Lys Trp Gln Gln Val Tyr Ser His Arg Asp Gly Arg

35 40 45

Lys Gln Gln Met Thr Glu Glu Gln Arg Glu Trp Leu Ser Tyr Gly Cys

50 55 60

Val Gly Val Thr Trp Val Asn Ser Gly Gln Tyr Pro Thr Asn Arg Leu

65 70 75 80

Ala Phe Ala Ser Phe Asp Glu Asp Arg Phe Lys Asn Glu Leu Lys Asn

85 90 95

Gly Arg Pro Arg Ser Gly Glu Thr Arg Ala Glu Phe Glu Gly Arg Val

100 105 110

Ala Lys Glu Ser Phe Asp Glu Glu Lys Gly Phe Gln Arg Ala Arg Glu

115 120 125

Val Ala Ser Val Met Asn Arg Ala Leu Glu Asn Ala His Asp Glu Ser

130 135 140

Ala Tyr Leu Asp Asn Leu Lys Lys Glu Leu Ala Asn Gly Asn Asp Ala

145	150	155	160
Leu Arg Asn Glu Asp Ala Arg Ser Pro Phe Tyr Ser Ala Leu Arg Asn			
	165	170	175
Thr Pro Ser Phe Lys Glu Arg Asn Gly Gly Asn His Asp Pro Ser Arg			
	180	185	190
Met Lys Ala Val Ile Tyr Ser Lys His Phe Trp Ser Gly Gln Asp Arg			
	195	200	205
Ser Ser Ser Ala Asp Lys Arg Lys Tyr Gly Asp Pro Asp Ala Phe Arg			
	210	215	220
Pro Ala Pro Gly Thr Gly Leu Val Asp Met Ser Arg Asp Arg Asn Ile			
225	230	235	240
Pro Arg Ser Pro Thr Ser Pro Gly Glu Gly Phe Val Asn Phe Asp Tyr			
	245	250	255
Gly Trp Phe Gly Ala Gln Thr Glu Ala Asp Ala Asp Lys Thr Val Trp			
	260	265	270
Thr His Gly Asn His Tyr His Ala Pro Asn Gly Ser Leu Gly Ala Met			
	275	280	285
His Val Tyr Glu Ser Lys Phe Arg Asn Trp Ser Glu Gly Tyr Ser Asp			
	290	295	300

Phe Asp Arg Gly Ala Tyr Val Ile Thr Phe Ile Pro Lys Ser Trp Asn
305 310 315 320

Thr Ala Pro Asp Lys Val Lys Gln Gly Trp Pro
325 330

<210> 6

<211> 782

<212> DNA

<213> *Corynebacterium glutamicum*

<220>

<221> CDS

<222> (579)..(782)

<400> 6

aaattcctgt gaattagctg atttagtact tttcggaggt gtctattctt accaaatcgt 60

caagttgtgg gtagagtcac ctgaatatta attgcaccgc acgggtgata tatgcttatt 120

tgctcaagta gttcgaggtt aagtgtattt taggtgaaca aatttcagct tcgggtagaa 180

gactttcgat gcgcttcaga gcttctattg ggaaatctga caccacttga ttaaatagcc 240

tacccccgaa ttgggggatt ggtcattttt tgctgtgaag gtagttttga tgcataatgac 300

ctgcgtttat aaagaaatgt aaacgtgac agatcgatat aaaagaaaca gtttgtactc 360

aggtttgaag cattttctcc gattgcctg gcaaaaatct caattgtcgc ttacagtttt 420

tctcaacgac aggctgctaa gctgctagtt cgggtggccta gtgagtggcg tttacttgga 480

taaaagtaat cccatgtcgt gatcagccat tttgggttgt ttccatagca atccaaaggt 540

ttcgtctttc gataacctatt caaggagcct tcgcctct atg ttt aac aac cgt atc 596

Met Phe Asn Asn Arg Ile

1

5

cgc act gca gct ctc gct ggt gca atc gca atc tcc acc gca gct tcc 644

Arg Thr Ala Ala Leu Ala Gly Ala Ile Ala Ile Ser Thr Ala Ala Ser

10

15

20

ggc gta gct atc cca gca ttc gct cag gag acc aac cca acc ttc aac 692

Gly Val Ala Ile Pro Ala Phe Ala Gln Glu Thr Asn Pro Thr Phe Asn

25

30

35

atc aac aac ggc ttc aac gat gct gat gga tcc acc atc cag cca gtt 740

Ile Asn Asn Gly Phe Asn Asp Ala Asp Gly Ser Thr Ile Gln Pro Val

40

45

50

gag cca gtt aac cac acc gag gaa acc ctc cgc gac ctg act 782

Glu Pro Val Asn His Thr Glu Glu Thr Leu Arg Asp Leu Thr

55

60

65

<210> 7

<211> 68

<212> PRT

<213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 7

Met Phe Asn Asn Arg Ile Arg Thr Ala Ala Leu Ala Gly Ala Ile Ala

1

5

10

15

Ile Ser Thr Ala Ala Ser Gly Val Ala Ile Pro Ala Phe Ala Gln Glu

20

25

30

Thr Asn Pro Thr Phe Asn Ile Asn Asn Gly Phe Asn Asp Ala Asp Gly

35

40

45

Ser Thr Ile Gln Pro Val Glu Pro Val Asn His Thr Glu Glu Thr Leu

50

55

60

Arg Asp Leu Thr

65

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 8

gactccgacg acagggtcac ccctcccgcc

30

<210> 9

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 9

cgctcacatc acggccagcc ctgctttacc

30

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 10

gtgaccctgt cgtcggagtc

20

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 11

ggcatcctgt cgagcggctc

20

<210> 12

<211> 1809

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<220>

<221> CDS

<222> (578)..(1798)

<400> 12

gtcgacgcgg gccgggaggg ggtgcggcgg cgcccttcgg ctgtgtggac gaagcgtcgg 60

gtcggagggg cgccggata tcgtccttgg ggcggggtgg ccggaattgc cgccatggtg 120

ttgccgggga atcgaccga agacatgac acttctcgta tccacccgat cacgtatccg 180

ggagtcgaga agtgttacgc cgtgcccctg tccgcgtcct caccctgtc gccgtgacag 240

cgaccgcgt tcttcactc gcacggacgg cccacagga ctttcggcc cgggctcgcc 300

ccgccgctc ggtgacggc tccgaataac gcggccgccc gggcctcgcc cggttgaccg 360

atccgggtca cgcgccccgc cgggcgggcg gccacgtccg gtctcgcccc gcccgacatc 420

ggctgegact gccttcgtc gcattcttc ccgctcccg gccgcgtttt tccgccgccc 480

aaggtgcggc gacgcgtacc gaatccccct tcctcgcgac gtgcttcgc acggccgct 540

tcaacgatgt tccacgacaa aggagttgca gtttcc atg cgc ata cgc cgg aga 595

Met Arg Ile Arg Arg Arg

1

5

gct ctc gtc ttc gcc act atg agt gcg gtg tta tgc acc gcc gga ttc 643

Ala Leu Val Phe Ala Thr Met Ser Ala Val Leu Cys Thr Ala Gly Phe

10

15

20

atg ccg tcg gcc ggc gag gcc gcc gcc gac aat ggc gcg ggg gaa gag 691

Met Pro Ser Ala Gly Glu Ala Ala Ala Asp Asn Gly Ala Gly Glu Glu

25

30

35

acg aag tcc tac gcc gaa acc tac cgc ctc acg gcg gat gac gtc gcg 739

Thr Lys Ser Tyr Ala Glu Thr Tyr Arg Leu Thr Ala Asp Asp Val Ala

40

45

50

aac atc aac gcg ctc aac gaa agc gct ccg gcc gct tcg agc gcc ggc 787
 Asn Ile Asn Ala Leu Asn Glu Ser Ala Pro Ala Ala Ser Ser Ala Gly
 55 60 65 70

ccg tcg ttc cgg gcc ccc gac tcc gac gac agg gtc acc cct ccc gcc 835
 Pro Ser Phe Arg Ala Pro Asp Ser Asp Asp Arg Val Thr Pro Pro Ala
 75 80 85

gag ccg ctc gac agg atg ccc gac ccg tac cgt ccc tcg tac ggc agg 883
 Glu Pro Leu Asp Arg Met Pro Asp Pro Tyr Arg Pro Ser Tyr Gly Arg
 90 95 100

gcc gag acg gtc gtc aac aac tac ata cgc aag tgg cag cag gtc tac 931
 Ala Glu Thr Val Val Asn Asn Tyr Ile Arg Lys Trp Gln Gln Val Tyr
 105 110 115

agc cac cgc gac ggc agg aag cag cag atg acc gag gag cag cgg gag 979
 Ser His Arg Asp Gly Arg Lys Gln Gln Met Thr Glu Glu Gln Arg Glu
 120 125 130

tgg ctg tcc tac ggc tgc gtc ggt gtc acc tgg gtc aat tcg ggt cag 1027
 Trp Leu Ser Tyr Gly Cys Val Gly Val Thr Trp Val Asn Ser Gly Gln
 135 140 145 150

tac ccg acg aac aga ctg gcc ttc gcg tcc ttc gac gag gac agg ttc 1075
 Tyr Pro Thr Asn Arg Leu Ala Phe Ala Ser Phe Asp Glu Asp Arg Phe
 155 160 165

aag aac gag ctg aag aac ggc agg ccc cgg tcc ggc gag acg cgg gcg 1123

Lys Asn Glu Leu Lys Asn Gly Arg Pro Arg Ser Gly Glu Thr Arg Ala
 170 175 180

gag ttc gag ggc cgc gtc gcg aag gag agc ttc gac gag gag aag ggc 1171
 Glu Phe Glu Gly Arg Val Ala Lys Glu Ser Phe Asp Glu Glu Lys Gly
 185 190 195

ttc cag cgg gcg cgt gag gtg gcg tcc gtc atg aac agg gcc ctg gag 1219
 Phe Gln Arg Ala Arg Glu Val Ala Ser Val Met Asn Arg Ala Leu Glu
 200 205 210

aac gcc cac gac gag agc gct tac ctc gac aac ctc aag aag gaa ctg 1267
 Asn Ala His Asp Glu Ser Ala Tyr Leu Asp Asn Leu Lys Lys Glu Leu
 215 220 225 230

gcg aac ggc aac gac gcc ctg cgc aac gag gac gcc cgt tcc ccg ttc 1315
 Ala Asn Gly Asn Asp Ala Leu Arg Asn Glu Asp Ala Arg Ser Pro Phe
 235 240 245

tac tcg gcg ctg cgg aac acg ccg tcc ttc aag gag cgg aac gga ggc 1363
 Tyr Ser Ala Leu Arg Asn Thr Pro Ser Phe Lys Glu Arg Asn Gly Gly
 250 255 260

aat cac gac ccg tcc agg atg aag gcc gtc atc tac tcg aag cac ttc 1411
 Asn His Asp Pro Ser Arg Met Lys Ala Val Ile Tyr Ser Lys His Phe
 265 270 275

tgg agc ggc cag gac cgg tcg agt tcg gcc gac aag agg aag tac ggc 1459
 Trp Ser Gly Gln Asp Arg Ser Ser Ser Ala Asp Lys Arg Lys Tyr Gly

280	285	290	
gac ccg gac gcc ttc cgc ccc gcc ccg ggc acc ggc ctg gtc gac atg			1507
Asp Pro Asp Ala Phe Arg Pro Ala Pro Gly Thr Gly Leu Val Asp Met			
295	300	305	310
tcg agg gac agg aac att ccg cgc agc ccc acc agc ccc ggt gag gga			1555
Ser Arg Asp Arg Asn Ile Pro Arg Ser Pro Thr Ser Pro Gly Glu Gly			
	315	320	325
ttc gtc aat ttc gac tac ggc tgg ttc ggc gcc cag acg gaa gcg gac			1603
Phe Val Asn Phe Asp Tyr Gly Trp Phe Gly Ala Gln Thr Glu Ala Asp			
	330	335	340
gcc gac aag acc gtc tgg acc cac gga aat cac tat cac gcg ccc aat			1651
Ala Asp Lys Thr Val Trp Thr His Gly Asn His Tyr His Ala Pro Asn			
	345	350	355
ggc agc ctg ggt gcc atg cat gtc tac gag agc aag ttc cgc aac tgg			1699
Gly Ser Leu Gly Ala Met His Val Tyr Glu Ser Lys Phe Arg Asn Trp			
	360	365	370
tcc gag ggt tac tcg gac ttc gac cgc gga gcc tat gtg atc acc ttc			1747
Ser Glu Gly Tyr Ser Asp Phe Asp Arg Gly Ala Tyr Val Ile Thr Phe			
	375	380	385
atc ccc aag agc tgg aac acc gcc ccc gac aag gta aag cag ggc tgg			1795
Ile Pro Lys Ser Trp Asn Thr Ala Pro Asp Lys Val Lys Gln Gly Trp			
	395	400	405

ccg tgatgtgagc g

1809

Pro

<210> 13

<211> 407

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 13

Met Arg Ile Arg Arg Arg Ala Leu Val Phe Ala Thr Met Ser Ala Val

1 5 10 15

Leu Cys Thr Ala Gly Phe Met Pro Ser Ala Gly Glu Ala Ala Ala Asp

20 25 30

Asn Gly Ala Gly Glu Glu Thr Lys Ser Tyr Ala Glu Thr Tyr Arg Leu

35 40 45

Thr Ala Asp Asp Val Ala Asn Ile Asn Ala Leu Asn Glu Ser Ala Pro

50 55 60

Ala Ala Ser Ser Ala Gly Pro Ser Phe Arg Ala Pro Asp Ser Asp Asp

65 70 75 80

Arg Val Thr Pro Pro Ala Glu Pro Leu Asp Arg Met Pro Asp Pro Tyr

85 90 95

Arg Pro Ser Tyr Gly Arg Ala Glu Thr Val Val Asn Asn Tyr Ile Arg

100

105

110

Lys Trp Gln Gln Val Tyr Ser His Arg Asp Gly Arg Lys Gln Gln Met

115

120

125

Thr Glu Glu Gln Arg Glu Trp Leu Ser Tyr Gly Cys Val Gly Val Thr

130

135

140

Trp Val Asn Ser Gly Gln Tyr Pro Thr Asn Arg Leu Ala Phe Ala Ser

145

150

155

160

Phe Asp Glu Asp Arg Phe Lys Asn Glu Leu Lys Asn Gly Arg Pro Arg

165

170

175

Ser Gly Glu Thr Arg Ala Glu Phe Glu Gly Arg Val Ala Lys Glu Ser

180

185

190

Phe Asp Glu Glu Lys Gly Phe Gln Arg Ala Arg Glu Val Ala Ser Val

195

200

205

Met Asn Arg Ala Leu Glu Asn Ala His Asp Glu Ser Ala Tyr Leu Asp

210

215

220

Asn Leu Lys Lys Glu Leu Ala Asn Gly Asn Asp Ala Leu Arg Asn Glu

225

230

235

240

Asp Ala Arg Ser Pro Phe Tyr Ser Ala Leu Arg Asn Thr Pro Ser Phe

245	250	255
Lys Glu Arg Asn Gly Gly Asn His Asp Pro Ser Arg Met Lys Ala Val		
260	265	270
Ile Tyr Ser Lys His Phe Trp Ser Gly Gln Asp Arg Ser Ser Ser Ala		
275	280	285
Asp Lys Arg Lys Tyr Gly Asp Pro Asp Ala Phe Arg Pro Ala Pro Gly		
290	295	300
Thr Gly Leu Val Asp Met Ser Arg Asp Arg Asn Ile Pro Arg Ser Pro		
305	310	315
320		
Thr Ser Pro Gly Glu Gly Phe Val Asn Phe Asp Tyr Gly Trp Phe Gly		
325	330	335
Ala Gln Thr Glu Ala Asp Ala Asp Lys Thr Val Trp Thr His Gly Asn		
340	345	350
His Tyr His Ala Pro Asn Gly Ser Leu Gly Ala Met His Val Tyr Glu		
355	360	365
Ser Lys Phe Arg Asn Trp Ser Glu Gly Tyr Ser Asp Phe Asp Arg Gly		
370	375	380
Ala Tyr Val Ile Thr Phe Ile Pro Lys Ser Trp Asn Thr Ala Pro Asp		
385	390	395
400		

Lys Val Lys Gln Gly Trp Pro

405

<210> 14

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 14

aaattcctgt gaattagctg atttag

26

<210> 15

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 15

gagctctccg gcgtatgcgc atagaggcga aggctccttg aata

44

<210> 16

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 16

atgcgcatac gccggagagc tctcgtcttc

30

<210> 17

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 17

ggggtgacct tgcgtcgga gtcgttgaag ccgttgtga tgttgaa

47

<210> 18

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 18

cttcgtctct tccccgcgc cattgtcagc gaatgtggg atagcaacgc c 51

<210> 19

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 19

cttcgtctct tccccgcgc cattgtcctg agcgaatgct gggatagcta c 51

<210> 20

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 20

cttcgtctct tccccgcgc cattgtcggtt gaagccgttg ttgatgttga a 51

<210> 21

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 21

cttcgtctct tccccgcgc cattgtcagt caggtcgcgg agggtttcct c 51

<210> 22

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 22

gacaatggcg cgggggaaga gacgaagtcc 30

<210> 23

<211> 25

<212> DNA

ccg tgatgtgagc g

1809

Pro

<210> 13

<211> 407

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 13

Met Arg Ile Arg Arg Arg Ala Leu Val Phe Ala Thr Met Ser Ala Val

1

5

10

15

Leu Cys Thr Ala Gly Phe Met Pro Ser Ala Gly Glu Ala Ala Ala Asp

20

25

30

Asn Gly Ala Gly Glu Glu Thr Lys Ser Tyr Ala Glu Thr Tyr Arg Leu

35

40

45

Thr Ala Asp Asp Val Ala Asn Ile Asn Ala Leu Asn Glu Ser Ala Pro

50

55

60

Ala Ala Ser Ser Ala Gly Pro Ser Phe Arg Ala Pro Asp Ser Asp Asp

65

70

75

80

Arg Val Thr Pro Pro Ala Glu Pro Leu Asp Arg Met Pro Asp Pro Tyr

85

90

95

Arg Pro Ser Tyr Gly Arg Ala Glu Thr Val Val Asn Asn Tyr Ile Arg

100

105

110

Lys Trp Gln Gln Val Tyr Ser His Arg Asp Gly Arg Lys Gln Gln Met

115

120

125

Thr Glu Glu Gln Arg Glu Trp Leu Ser Tyr Gly Cys Val Gly Val Thr

130

135

140

Trp Val Asn Ser Gly Gln Tyr Pro Thr Asn Arg Leu Ala Phe Ala Ser

145

150

155

160

Phe Asp Glu Asp Arg Phe Lys Asn Glu Leu Lys Asn Gly Arg Pro Arg

165

170

175

Ser Gly Glu Thr Arg Ala Glu Phe Glu Gly Arg Val Ala Lys Glu Ser

180

185

190

Phe Asp Glu Glu Lys Gly Phe Gln Arg Ala Arg Glu Val Ala Ser Val

195

200

205

Met Asn Arg Ala Leu Glu Asn Ala His Asp Glu Ser Ala Tyr Leu Asp

210

215

220

Asn Leu Lys Lys Glu Leu Ala Asn Gly Asn Asp Ala Leu Arg Asn Glu

225

230

235

240

Asp Ala Arg Ser Pro Phe Tyr Ser Ala Leu Arg Asn Thr Pro Ser Phe

	245		250		255										
Lys	Glu	Arg	Asn	Gly	Gly	Asn	His	Asp	Pro	Ser	Arg	Met	Lys	Ala	Val
	260							265					270		
Ile	Tyr	Ser	Lys	His	Phe	Trp	Ser	Gly	Gln	Asp	Arg	Ser	Ser	Ser	Ala
	275							280					285		
Asp	Lys	Arg	Lys	Tyr	Gly	Asp	Pro	Asp	Ala	Phe	Arg	Pro	Ala	Pro	Gly
	290							295					300		
Thr	Gly	Leu	Val	Asp	Met	Ser	Arg	Asp	Arg	Asn	Ile	Pro	Arg	Ser	Pro
305								310				315			320
Thr	Ser	Pro	Gly	Glu	Gly	Phe	Val	Asn	Phe	Asp	Tyr	Gly	Trp	Phe	Gly
								325					330		335
Ala	Gln	Thr	Glu	Ala	Asp	Ala	Asp	Lys	Thr	Val	Trp	Thr	His	Gly	Asn
								340					345		350
His	Tyr	His	Ala	Pro	Asn	Gly	Ser	Leu	Gly	Ala	Met	His	Val	Tyr	Glu
								355					360		365
Ser	Lys	Phe	Arg	Asn	Trp	Ser	Glu	Gly	Tyr	Ser	Asp	Phe	Asp	Arg	Gly
								370					375		380
Ala	Tyr	Val	Ile	Thr	Phe	Ile	Pro	Lys	Ser	Trp	Asn	Thr	Ala	Pro	Asp
385								390					395		400

Lys Val Lys Gln Gly Trp Pro

405

<210> 14

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 14

aaattcctgt gaattagctg atttag

26

<210> 15

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 15

gagctctccg gcgtatgcgc atagaggcga aggctccttg aata

44

<210> 16

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 16

atgcgcatac gccggagagc tctcgtcttc

30

<210> 17

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 17

ggggtgaccc tgcgtcgga gtcgttgaag ccgttggtga tgttgaa

47

<210> 18

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 18

cttcgtctct tccccgcgc cattgtcagc gaatgtggg atagcaacgc c 51

<210> 19

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 19

cttcgtctct tccccgcgc cattgtcctg agcgaatgct gggatagcta c 51

<210> 20

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 20

cttcgtctct tccccgcgc cattgtcggtt gaagccgttg ttgatgttga a 51

<210> 21

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 21

cttcgtctct tccccgcgc cattgtcagt caggtcggg agggtttcct c 51

<210> 22

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 22

gacaatggcg cgggggaaga gacgaagtcc 30

<210> 23

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 23

gcccagaagc ccaaaattga gattt

25

<210> 24

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 24

cttcgtctct tccccgcgc cattgtctgc cgttgccaca ggtgcggcca gc

52

<210> 25

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 25

cgcagccagc gatttcatgc gtttcataga ggccaaggct ccttgaatag gt 52

<210> 26

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 26

atgaaacgca tgaaatcgct ggctgcggcg 30

<210> 27

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 27

ggatccggag cttatcgact gcacg 25

<210> 28

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 28

cgcagccagc gatttcatgc gtttcataat tctgtttcct gtgtgaaatt gt 52

<210> 29

<211> 43

<212> PRT

<213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 29

Met Arg Asp Thr Ala Phe Arg Ser Ile Lys Ala Lys Ala Gln Ala Lys

1 5 10 15

Arg Arg Ser Leu Trp Ile Ala Ala Gly Ala Val Pro Thr Ala Ile Ala

20 25 30

Leu Thr Met Ser Leu Ala Pro Met Ala Ser Ala

35 40

<210> 30

<211> 43

<212> PRT

<213> Streptoverticillium mobaraense

<400> 30

Asp Asn Gly Ala Gly Glu Glu Thr Lys Ser Tyr Ala Glu Thr Tyr Arg

1 5 10 15

Leu Thr Ala Asp Asp Val Ala Asn Ile Asn Ala Leu Asn Glu Ser Ala

20 25 30

Pro Ala Ala Ser Ser Ala Gly Pro Ser Phe Arg

35 40

<210> 31

<211> 41

<212> PRT

<213> Streptoverticillium mobaraense

<400> 31

Asp Asn Gly Ala Gly Glu Glu Thr Lys Ser Tyr Ala Glu Thr Tyr Arg

1 5 10 15

Leu Thr Ala Asp Asp Val Ala Asn Ile Asn Ala Leu Asn Glu Ser Ala

20 25 30

Pro Ala Ala Ser Ser Ala Gly Pro Ser

35 40

<210> 32

<211> 44

<212> PRT

<213> Streptovercillium mobaraense

<400> 32

Asn Gly Ala Gly Glu Glu Thr Lys Ser Tyr Ala Glu Thr Tyr Arg Leu
1 5 10 15

Thr Ala Asp Asp Val Ala Asn Ile Asn Ala Leu Asn Glu Ser Ala Pro
20 25 30

Ala Ala Ser Ser Ala Gly Pro Ser Phe Arg Ala Pro
35 40

<210> 33

<211> 39

<212> PRT

<213> Streptovercillium mobaraense

<400> 33

Glu Thr Lys Ser Tyr Ala Glu Thr Tyr Arg Leu Thr Ala Asp Asp Val
1 5 10 15

Ala Asn Ile Asn Ala Leu Asn Glu Ser Ala Pro Ala Ala Ser Ser Ala
20 25 30

Gly Pro Ser Phe Arg Ala Pro

35

<210> 34

<211> 45

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:modified

pro-region of transglutaminase from

Streptoverticillium mobaraense

<400> 34

Asp Asn Gly Ala Gly Glu Glu Thr Lys Ser Tyr Ala Glu Thr Tyr Arg

1

5

10

15

Leu Thr Ala Asp Asp Val Ala Asn Ile Asn Ala Leu Asn Glu Ser Ala

20

25

30

Pro Ala Ala Ser Ser Ala Gly Pro Ser Phe Gly Pro Lys

35

40

45

<210> 35

<211> 45

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:modified
pro-region of transglutaminase from
Streptovercillium mobaraense

<400> 35

Asp Asn Gly Ala Gly Glu Glu Thr Lys Ser Tyr Ala Glu Thr Tyr Arg
1 5 10 15

Leu Thr Ala Asp Asp Val Ala Asn Ile Asn Ala Leu Asn Glu Ser Ala
20 25 30

Pro Ala Ala Ser Ser Ala Gly Pro Ser Phe Gly Pro Arg
35 40 45

<210> 36

<211> 41

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:modified
pro-region of transglutaminase from
Streptovercillium mobaraense

<400> 36

Asp Asn Gly Ala Gly Glu Glu Thr Lys Ser Tyr Ala Glu Thr Tyr Arg

1 5 10 15
Leu Thr Ala Asp Asp Val Ala Asn Ile Asn Ala Leu Asn Glu Ser Ala
20 25 30
Pro Ala Ala Ser Ser Ala Gly Pro Lys
35 40

<210> 37

<211> 41

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:modified

pro-region of transglutaminase from

Streptovercillium mobaraense

<400> 37

Asp Asn Gly Ala Gly Glu Glu Thr Lys Ser Tyr Ala Glu Thr Tyr Arg
1 5 10 15

Leu Thr Ala Asp Asp Val Ala Asn Ile Asn Ala Leu Asn Glu Ser Ala
20 25 30

Pro Ala Ala Ser Ser Ala Gly Pro Arg
35 40

<210> 38

<211> 56

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:chimera
pro-region of transglutaminase from
Streptovercillium mobaraence and
Streptovercillium cinnamoneum

<400> 38

Asp Asn Gly Ala Gly Glu Glu Thr Lys Ser Tyr Ala Glu Thr Tyr Arg

1 5 10 15

Leu Thr Ala Asp Asp Val Glu Ser Ile Asn Ala Leu Asn Glu Arg Ala

20 25 30

Leu Thr Leu Gly Gln Pro Gly Lys Pro Pro Lys Glu Leu Pro Pro Ser

35 40 45

Ala Ser Ala Pro Ser Arg Ala Pro

50 55

<210> 39

<211> 1079

<212> PRT

<213> Streptomyces albogriseolus

<400> 39

Asn Gly Glu Asn Ser Thr Ala Ala Gly Ser Ser Ala Ser Ala Thr Ala
1 5 10 15

Leu Lys Gly Lys His Arg Val Thr Leu Ile Thr Gly Asp Arg Val Ala
20 25 30

Leu Asp Ala Lys Gly Arg Val Val Gly Leu Glu Pro Ala Glu Gly Arg
35 40 45

Glu His Ile Pro Val Gln Ile Arg Arg Ser Asp Gly His Thr Leu Val
50 55 60

Val Pro Ala Asp Ala Ala Arg Leu Val Ala Ser Gly Lys Leu Asp Gln
65 70 75 80

Arg Leu Phe Asp Val Thr Glu Leu Asn Lys Ala Ala Thr Arg Thr Ala
85 90 95

His Arg Gly Gly Leu Lys Val Ile Val Gly Tyr Arg Gly Ala Ala Lys
100 105 110

Ala Ala Lys Ala Asp Val Arg Asp Ala Gly Thr Val Arg Arg Thr Leu
115 120 125

Thr Ser Leu Asn Ala Asp Ala Val Gln Thr Pro Gln Glu Ala Gly Ala
130 135 140

Glu Leu Trp Glu Ala Val Thr Asp Gly Asp Arg Thr Ala Ser Gly Val
145 150 155 160

Ala Arg Val Trp Leu Asp Gly Val Arg Lys Ala Ser Leu Asp Thr Ser
165 170 175

Val Gly Gln Ile Gly Thr Pro Lys Ala Trp Glu Ala Gly Tyr Asp Gly
180 185 190

Lys Gly Val Lys Ile Ala Val Leu Asp Thr Gly Val Asp Ala Thr His
195 200 205

Pro Asp Leu Lys Gly Gln Val Thr Ala Ser Lys Asn Phe Thr Ser Ala
210 215 220

Pro Thr Thr Gly Asp Val Val Gly His Gly Thr His Val Ala Ser Ile
225 230 235 240

Ala Ala Gly Thr Gly Ala Gln Ser Lys Gly Thr Tyr Lys Gly Val Ala
245 250 255

Pro Gly Ala Lys Ile Leu Asn Gly Lys Val Leu Asp Asp Ala Gly Phe
260 265 270

Gly Asp Asp Ser Gly Ile Leu Ala Gly Met Glu Trp Ala Ala Ala Gln
275 280 285

Gly Ala Asp Ile Val Asn Met Ser Leu Gly Gly Met Asp Thr Pro Glu

290	295	300	
Thr Asp Pro Leu Glu Ala Ala Val Asp Lys Leu Ser Ala Glu Lys Gly			
305	310	315	320
Ile Leu Phe Ala Ile Ala Ala Gly Asn Glu Gly Pro Gln Ser Ile Gly			
	325	330	335
Ser Pro Gly Ser Ala Asp Ser Ala Leu Thr Val Gly Ala Val Asp Asp			
	340	345	350
Lys Asp Lys Leu Ala Asp Phe Ser Ser Thr Gly Pro Arg Leu Gly Asp			
	355	360	365
Gly Ala Val Lys Pro Asp Leu Thr Ala Pro Gly Val Asp Ile Thr Ala			
	370	375	380
Ala Ser Ala Lys Gly Asn Asp Ile Ala Lys Glu Val Gly Glu Lys Pro			
385	390	395	400
Ala Gly Tyr Met Thr Ile Ser Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val			
	405	410	415
Ala Gly Ala Ala Ala Leu Leu Lys Gln Gln His Pro Glu Trp Lys Tyr			
	420	425	430
Ala Glu Leu Lys Gly Ala Leu Thr Ala Ser Thr Lys Asp Gly Lys Tyr			
	435	440	445

Thr Pro Phe Glu Gln Gly Ser Gly Arg Val Gln Val Asp Lys Ala Ile
450 455 460

Thr Gln Thr Val Ile Ala Glu Pro Val Ser Leu Ser Phe Gly Val Gln
465 470 475 480

Gln Trp Pro His Ala Asp Asp Lys Pro Val Thr Lys Lys Leu Thr Tyr
485 490 495

Arg Asn Leu Gly Thr Glu Asp Val Thr Leu Lys Leu Thr Ser Thr Ala
500 505 510

Thr Gly Pro Lys Gly Lys Ala Ala Pro Ala Gly Phe Phe Thr Leu Gly
515 520 525

Ala Ser Thr Leu Thr Val Pro Ala Asn Gly Thr Ala Ser Val Asp Val
530 535 540

Thr Ala Asp Thr Arg Leu Gly Gly Ala Val Asp Gly Thr Tyr Ser Ala
545 550 555 560

Tyr Val Val Ala Thr Gly Ala Gly Gln Ser Val Arg Thr Ala Ala Ala
565 570 575

Val Glu Arg Glu Val Glu Ser Tyr Asn Val Thr Leu Lys Val Leu Asp
580 585 590

Arg Ser Gly Lys Ala Thr Ala Asn Tyr Met Ala Tyr Leu Ser Gly Leu
595 600 605

Thr Gly Leu Gly Lys Asp Arg Ser Tyr Ala Pro Tyr Glu Ala Asp Gly

610

615

620

Ala Val Ser Val Arg Val Pro Lys Gly Gly Tyr Val Leu Asp Ala Ser

625

630

635

640

Val Leu Val Gly Ala Asp Pro Glu Thr Trp Arg Gly Ala Asp Trp Leu

645

650

655

Ala Gln Pro Lys Leu Asp Val Thr Arg Asn Thr Thr Val Thr Val Asp

660

665

670

Ala Arg Lys Ala Lys Pro Val Lys Val Thr Val Pro Gly Lys Ala Ala

675

680

685

Lys Ala Gln Phe Ala Ser Ala Asp Tyr Thr Ile Glu Thr Asn Asp Ser

690

695

700

Ala Val Ser Tyr Gly Trp Trp Leu Glu Asn Tyr Ser Gly Phe Arg Ser

705

710

715

720

Ala His Leu Gly Pro Gln Ile Thr Asn Gly Thr Leu Ser Gln Gln Trp

725

730

735

Asn Thr His Phe Ser Asn Gly Ala Lys Ala Gln Tyr Thr Ala Ile Ser

740

745

750

Gly Gly Lys Val Lys Lys Leu Ala Thr Gly Tyr Thr Arg Ala Phe Lys

755	760	765
Ala Lys Glu Phe Ala Thr Val Gln Val Gly Met Gly Ala Ala Ala Ser		
770	775	780
Gly Lys Lys Gly Ala Val Thr Ala Phe Gly Trp Leu Pro Gly Ser Ser		
785	790	795 800
Gly Ala Ser Gly Phe Ser Gln Glu Gln Lys Leu Pro Ser Thr Arg Thr		
805	810	815
Leu Tyr Leu Ser Thr Val Asn Gly Val Thr Trp Asp Leu Asp Phe Glu		
820	825	830
Gln Leu Gly Gly Val Asp Asn Glu Gly Trp Pro Ile Tyr Asp Ala Val		
835	840	845
Tyr Thr Ile Gly Val Gly Lys Thr Tyr Lys Gly Gly Lys Thr Tyr Lys		
850	855	860
Glu Thr Val Asn Thr Ala Val Phe Gly Pro Arg Leu Thr Ser Ser Tyr		
865	870	875 880
Gly Val Phe Arg Asp Gly Asn Ser Ile Tyr Gly Val Ile Pro Leu Phe		
885	890	895
Ala Asp Gly Lys Gly His Ala Gly Ser Ser Glu Phe Ser Ser Ala Val		
900	905	910

Thr Thr Leu Tyr Arg Asn Gly Lys Lys Val Gly Ser Asn Asn Asp Pro
915 920 925

Leu Phe Gly Glu Glu Gly Phe Thr Val Pro Ser Gly Asp Ala Ala Tyr
930 935 940

Arg Leu Thr Thr Ser Val Lys Arg Ser Ala Lys Val Ala Ala Ala Ser
945 950 955 960

Thr Arg Ile Asp Ala Ser Trp Thr Phe Arg Ser Lys Lys Thr Ser Gly
965 970 975

Glu Lys Gln Leu Pro Val Ser Ser Ala Arg Phe Ala Ala Val Thr Gly
980 985 990

Leu Asp Ser Lys Val Ala Ala Gly Lys Lys Ala Thr Phe Pro Val Val
995 1000 1005

Val Glu Gly Ala Ala Gln Gly Lys Asn Leu Lys Ser Leu Ala Val Tyr
1010 1015 1020

Val Ser Tyr Asn Gly Gly Lys Thr Trp Lys Lys Thr Thr Val Thr Lys
1025 1030 1035 1040

Gly Lys Ile Thr Val Lys Asn Pro Ala Lys Gly Lys Ala Ile Ser Phe
1045 1050 1055

Arg Ala Lys Ile Thr Asp Lys Lys Gly Asn Ala Ser Leu Ile Thr Ile
1060 1065 1070

His Asn Ala Tyr Tyr Gly Lys

1075

<210> 40

<211> 444

<212> PRT

<213> Streptovercillium mobaraense

<400> 40

Gln Ala Asp Ile Lys Asp Arg Ile Leu Lys Ile Pro Gly Met Lys Phe

1 5 10 15

Val Glu Glu Lys Pro Tyr Gln Gly Tyr Arg Tyr Leu Val Met Thr Tyr

20 25 30

Arg Gln Pro Val Asp His Arg Asn Pro Gly Lys Gly Thr Phe Glu Gln

35 40 45

Arg Phe Thr Leu Leu His Lys Asp Thr Asp Arg Pro Thr Val Phe Phe

50 55 60

Thr Ser Gly Tyr Asn Val Ser Thr Asn Pro Ser Arg Ser Glu Pro Thr

65 70 75 80

Arg Ile Val Asp Gly Asn Gln Val Ser Met Glu Tyr Arg Phe Phe Thr

85 90 95

Pro Ser Arg Pro Gln Pro Ala Asp Trp Ser Lys Leu Asp Ile Trp Gln
100 105 110

Ala Ala Ser Asp Gln His Arg Leu Tyr Gln Ala Leu Lys Pro Val Tyr
115 120 125

Gly Lys Asn Trp Leu Ala Thr Gly Gly Ser Lys Gly Gly Met Thr Ala
130 135 140

Thr Tyr Phe Arg Arg Phe Tyr Pro Asn Asp Met Asn Gly Thr Val Ala
145 150 155 160

Tyr Val Ala Pro Asn Asp Val Asn Asp Lys Glu Asp Ser Ala Tyr Asp
165 170 175

Lys Phe Phe Gln Asn Val Gly Asp Lys Ala Cys Arg Thr Gln Leu Asn
180 185 190

Ser Val Gln Arg Glu Ala Leu Val Arg Arg Asp Glu Ile Val Ala Arg
195 200 205

Tyr Glu Lys Trp Ala Lys Glu Asn Gly Lys Thr Phe Lys Val Val Gly
210 215 220

Ser Ala Asp Lys Ala Tyr Glu Asn Val Val Leu Asp Leu Val Trp Ser
225 230 235 240

Phe Trp Gln Tyr His Leu Gln Ser Asp Cys Ala Ser Val Pro Ala Thr
245 250 255

Lys Ala Ser Thr Asp Glu Leu Tyr Lys Phe Ile Asp Asp Ile Ser Gly

260

265

270

Phe Asp Gly Tyr Thr Asp Gln Gly Leu Glu Arg Phe Thr Pro Tyr Tyr

275

280

285

Tyr Gln Ala Gly Thr Gln Leu Gly Ala Pro Thr Val Lys Asn Pro His

290

295

300

Leu Lys Gly Val Leu Arg Tyr Pro Gly Ile Asn Gln Pro Arg Ser Tyr

305

310

315

320

Val Pro Arg Asp Ile Pro Met Thr Phe Arg Pro Gly Ala Met Ala Asp

325

330

335

Val Asp Arg Trp Val Arg Glu Asp Ser Arg Asn Met Leu Phe Val Tyr

340

345

350

Gly Gln Asn Asp Pro Trp Ser Gly Glu Pro Phe Arg Leu Gly Lys Gly

355

360

365

Ala Ala Ala Arg His Asp Tyr Arg Phe Tyr Ala Pro Gly Gly Asn His

370

375

380

Gly Ser Asn Ile Ala Gln Leu Val Ala Asp Glu Arg Ala Lys Ala Thr

385

390

395

400

Ala Glu Val Leu Lys Trp Ala Gly Val Ala Pro Gln Ala Val Gln Lys

405

410

415

Asp Glu Lys Ala Ala Lys Pro Leu Ala Pro Phe Asp Ala Lys Leu Asp

420

425

430

Arg Val Lys Asn Asp Lys Gln Ser Ala Leu Arg Pro

435

440

<210> 41

<211> 1751

<212> DNA

<213> Streptoverticillium mobaraense

<220>

<221> CDS

<222> (229)..(1659)

<400> 41

gtcctatga gcatcgacgc cgccagcagc gatcggttcg gtctgaccgt cgacgccgac 60

ggcgagcgcg tgtggctgga cgagcccggc cggcccgctgc cgctcgtgcg gccgtgaaag 120

gcccgaagag agcccaagcc gtgtgaactg cgaggacaaa gggctctggcg caacgcatgt 180

cacccagat aagttcgccg cgacctttgc gaaccaggg gagggcgc atg cgc aag 237

Met Arg Lys

1

gct ctc aga tcg ctg ctg gcg gcg tcg atg ctc ata gga gcg atc ggc 285
 Ala Leu Arg Ser Leu Leu Ala Ala Ser Met Leu Ile Gly Ala Ile Gly

5

10

15

gcc ggc agc gcc acg gcg gag gcg gcg tcg atc acc gcc ccg cag gcc 333
 Ala Gly Ser Ala Thr Ala Glu Ala Ala Ser Ile Thr Ala Pro Gln Ala

20

25

30

35

gac atc aag gac cgc atc ctg aag att ccc ggg atg aag ttc gtc gag 381
 Asp Ile Lys Asp Arg Ile Leu Lys Ile Pro Gly Met Lys Phe Val Glu

40

45

50

gag aag ccc tac cag ggc tac cgc tac ctc gtg atg acg tac cgg cag 429
 Glu Lys Pro Tyr Gln Gly Tyr Arg Tyr Leu Val Met Thr Tyr Arg Gln

55

60

65

ccg gtg gac cac cgc aat ccc ggc aag ggg acc ttc gag cag cgc ttc 477
 Pro Val Asp His Arg Asn Pro Gly Lys Gly Thr Phe Glu Gln Arg Phe

70

75

80

acc ctg ctc cac aag gac acc gac cgg ccg acc gtg ttc ttc acg tcc 525
 Thr Leu Leu His Lys Asp Thr Asp Arg Pro Thr Val Phe Phe Thr Ser

85

90

95

ggc tac aac gtc tcc acc aac ccc agc cgc agc gag ccc acg cgc atc 573
 Gly Tyr Asn Val Ser Thr Asn Pro Ser Arg Ser Glu Pro Thr Arg Ile

100

105

110

115

gtg gac ggc aac cag gtg tcg atg gag tac cgg ttc ttc acg ccg tcc 621

Val Asp Gly Asn Gln Val Ser Met Glu Tyr Arg Phe Phe Thr Pro Ser	
120 125 130	
cgg ccg cag ccc gcc gac tgg tcc aag ctg gac atc tgg cag gcg gcg	669
Arg Pro Gln Pro Ala Asp Trp Ser Lys Leu Asp Ile Trp Gln Ala Ala	
135 140 145	
agt gac cag cac cgc ctg tac cag gcg ctg aag ccg gtc tac ggg aag	717
Ser Asp Gln His Arg Leu Tyr Gln Ala Leu Lys Pro Val Tyr Gly Lys	
150 155 160	
aac tgg ctg gcc acg ggc ggc agc aag ggc ggc atg acg gcc acc tac	765
Asn Trp Leu Ala Thr Gly Gly Ser Lys Gly Gly Met Thr Ala Thr Tyr	
165 170 175	
ttc cgc cgc ttc tac ccg aac gac atg aac ggc acg gtc gcc tac gtc	813
Phe Arg Arg Phe Tyr Pro Asn Asp Met Asn Gly Thr Val Ala Tyr Val	
180 185 190 195	
gcg ccc aac gac gtg aac gac aag gaa gac tcg gcg tac gac aag ttc	861
Ala Pro Asn Asp Val Asn Asp Lys Glu Asp Ser Ala Tyr Asp Lys Phe	
200 205 210	
ttc cag aac gtc ggc gac aag gcg tgc cgc acg cag ctc aac tcg gtg	909
Phe Gln Asn Val Gly Asp Lys Ala Cys Arg Thr Gln Leu Asn Ser Val	
215 220 225	
cag cgc gag gcg ctc gtc cgc cgc gac gag atc gtc gcc cgc tac gag	957
Gln Arg Glu Ala Leu Val Arg Arg Asp Glu Ile Val Ala Arg Tyr Glu	

230	235	240	
aag tgg gct aag gag aac ggc aag acg ttc aag gtc gtc ggc agc gcc			1005
Lys Trp Ala Lys Glu Asn Gly Lys Thr Phe Lys Val Val Gly Ser Ala			
245	250	255	
gac aag gcg tac gag aac gtc gtc ctc gac ctg gtc tgg tcc ttc tgg			1053
Asp Lys Ala Tyr Glu Asn Val Val Leu Asp Leu Val Trp Ser Phe Trp			
260	265	270	275
cag tac cac ctg cag agc gac tgc gcc tcc gtc ccc gcc acc aag gcg			1101
Gln Tyr His Leu Gln Ser Asp Cys Ala Ser Val Pro Ala Thr Lys Ala			
280	285	290	
tcc acc gac gag ctg tac aag ttc atc gac gac atc tcg ggc ttc gac			1149
Ser Thr Asp Glu Leu Tyr Lys Phe Ile Asp Asp Ile Ser Gly Phe Asp			
295	300	305	
ggc tac acc gac cag ggc ctg gag cgc ttc acc ccg tac tac tac cag			1197
Gly Tyr Thr Asp Gln Gly Leu Glu Arg Phe Thr Pro Tyr Tyr Tyr Gln			
310	315	320	
gcg ggc acc cag ctc ggc gcc cct acg gtg aag aac ccg cac ctc aag			1245
Ala Gly Thr Gln Leu Gly Ala Pro Thr Val Lys Asn Pro His Leu Lys			
325	330	335	
ggc gtg ctg cgg tac ccc ggc atc aac cag ccg cgc tcg tac gtc ccc			1293
Gly Val Leu Arg Tyr Pro Gly Ile Asn Gln Pro Arg Ser Tyr Val Pro			
340	345	350	355

cgc gac atc ccg atg acc ttc cgc ccc ggc gcg atg gcg gac gtc gac 1341
 Arg Asp Ile Pro Met Thr Phe Arg Pro Gly Ala Met Ala Asp Val Asp
 360 365 370

cgc tgg gtg cgc gag gac agc cgg aac atg ctc ttc gtg tac ggg cag 1389
 Arg Trp Val Arg Glu Asp Ser Arg Asn Met Leu Phe Val Tyr Gly Gln
 375 380 385

aac gac ccg tgg agc ggt gaa ccg ttc cgc ctg ggc aag ggc gcc gcc 1437
 Asn Asp Pro Trp Ser Gly Glu Pro Phe Arg Leu Gly Lys Gly Ala Ala
 390 395 400

gcc cgg cac gac tac cgc ttc tac gcc ccg ggc ggc aac cac ggt tcc 1485
 Ala Arg His Asp Tyr Arg Phe Tyr Ala Pro Gly Gly Asn His Gly Ser
 405 410 415

aac atc gcc cag ttg gtg gcc gac gag cgg gcc aag gcc acg gcc gag 1533
 Asn Ile Ala Gln Leu Val Ala Asp Glu Arg Ala Lys Ala Thr Ala Glu
 420 425 430 435

gtc ctg aag tgg gcc ggt gtg gcg ccg cag gcc gtc cag aag gac gag 1581
 Val Leu Lys Trp Ala Gly Val Ala Pro Gln Ala Val Gln Lys Asp Glu
 440 445 450

aag gcc gcc aag ccg ctc gcg ccg ttc gac gcc aag ctc gac cgc gtg 1629
 Lys Ala Ala Lys Pro Leu Ala Pro Phe Asp Ala Lys Leu Asp Arg Val
 455 460 465

aag aac gac aag cag agc gcg ctg cgt ccg tagggaccca gtgcgtaagg 1679

Lys Asn Asp Lys Gln Ser Ala Leu Arg Pro

470

475

cggcggggcgc tcccggcgag gggcgccgc cgtcgcgttc cggaaggccc cgggtgccgc 1739

cgccggtgct tc

1751

<210> 42

<211> 477

<212> PRT

<213> *Streptoverticillium mobaraense*

<400> 42

Met Arg Lys Ala Leu Arg Ser Leu Leu Ala Ala Ser Met Leu Ile Gly

1

5

10

15

Ala Ile Gly Ala Gly Ser Ala Thr Ala Glu Ala Ala Ser Ile Thr Ala

20

25

30

Pro Gln Ala Asp Ile Lys Asp Arg Ile Leu Lys Ile Pro Gly Met Lys

35

40

45

Phe Val Glu Glu Lys Pro Tyr Gln Gly Tyr Arg Tyr Leu Val Met Thr

50

55

60

Tyr Arg Gln Pro Val Asp His Arg Asn Pro Gly Lys Gly Thr Phe Glu

65

70

75

80

Gln Arg Phe Thr Leu Leu His Lys Asp Thr Asp Arg Pro Thr Val Phe

85

90

95

Phe Thr Ser Gly Tyr Asn Val Ser Thr Asn Pro Ser Arg Ser Glu Pro

100

105

110

Thr Arg Ile Val Asp Gly Asn Gln Val Ser Met Glu Tyr Arg Phe Phe

115

120

125

Thr Pro Ser Arg Pro Gln Pro Ala Asp Trp Ser Lys Leu Asp Ile Trp

130

135

140

Gln Ala Ala Ser Asp Gln His Arg Leu Tyr Gln Ala Leu Lys Pro Val

145

150

155

160

Tyr Gly Lys Asn Trp Leu Ala Thr Gly Gly Ser Lys Gly Gly Met Thr

165

170

175

Ala Thr Tyr Phe Arg Arg Phe Tyr Pro Asn Asp Met Asn Gly Thr Val

180

185

190

Ala Tyr Val Ala Pro Asn Asp Val Asn Asp Lys Glu Asp Ser Ala Tyr

195

200

205

Asp Lys Phe Phe Gln Asn Val Gly Asp Lys Ala Cys Arg Thr Gln Leu

210

215

220

Asn Ser Val Gln Arg Glu Ala Leu Val Arg Arg Asp Glu Ile Val Ala

225 230 235 240

Arg Tyr Glu Lys Trp Ala Lys Glu Asn Gly Lys Thr Phe Lys Val Val

245 250 255

Gly Ser Ala Asp Lys Ala Tyr Glu Asn Val Val Leu Asp Leu Val Trp

260 265 270

Ser Phe Trp Gln Tyr His Leu Gln Ser Asp Cys Ala Ser Val Pro Ala

275 280 285

Thr Lys Ala Ser Thr Asp Glu Leu Tyr Lys Phe Ile Asp Asp Ile Ser

290 295 300

Gly Phe Asp Gly Tyr Thr Asp Gln Gly Leu Glu Arg Phe Thr Pro Tyr

305 310 315 320

Tyr Tyr Gln Ala Gly Thr Gln Leu Gly Ala Pro Thr Val Lys Asn Pro

325 330 335

His Leu Lys Gly Val Leu Arg Tyr Pro Gly Ile Asn Gln Pro Arg Ser

340 345 350

Tyr Val Pro Arg Asp Ile Pro Met Thr Phe Arg Pro Gly Ala Met Ala

355 360 365

Asp Val Asp Arg Trp Val Arg Glu Asp Ser Arg Asn Met Leu Phe Val

370 375 380

Glu Ala Tyr Arg Ala Tyr Gly Gly Arg Ala Thr Thr Val Val Asn Asn
20 25 30

Tyr Ile Arg Lys Trp Gln Gln Val Tyr Ser His Arg Asp Gly Lys Lys
35 40 45

Gln Gln Met Thr Glu Glu Gln Arg Glu Lys Leu Ser Tyr Gly Cys Val
50 55 60

Gly Val Thr Trp Val Asn Ser Gly Pro Tyr Pro Thr Asn Arg Leu Ala
65 70 75 80

Phe Ala Ser Phe Asp Glu Asn Lys Tyr Lys Asn Asp Leu Lys Asn Thr
85 90 95

Ser Pro Arg Pro Asp Glu Thr Arg Ala Glu Phe Glu Gly Arg Ile Ala
100 105 110

Lys Gly Ser Phe Asp Glu Gly Lys Gly Phe Lys Arg Ala Arg Asp Val
115 120 125

Ala Ser Val Met Asn Lys Ala Leu Glu Asn Ala His Asp Glu Gly Thr
130 135 140

Tyr Ile Asn Asn Leu Lys Thr Glu Leu Thr Asn Asn Asn Asp Ala Leu
145 150 155 160

Leu Arg Glu Asp Ser Arg Ser Asn Phe Tyr Ser Ala Leu Arg Asn Thr
165 170 175

Pro Ser Phe Lys Glu Arg Asp Gly Gly Asn Tyr Asp Pro Ser Lys Met

180

185

190

Lys Ala Val Ile Tyr Ser Lys His Phe Trp Ser Gly Gln Asp Gln Arg

195

200

205

Gly Ser Ser Asp Lys Arg Lys Tyr Gly Asp Pro Glu Ala Phe Arg Pro

210

215

220

Asp Gln Gly Thr Gly Leu Val Asp Met Ser Lys Asp Arg Ser Ile Pro

225

230

235

240

Arg Ser Pro Ala Lys Pro Gly Glu Gly Trp Val Asn Phe Asp Tyr Gly

245

250

255

Trp Phe Gly Ala Gln Thr Glu Ala Asp Ala Asp Lys Thr Thr Trp Thr

260

265

270

His Gly Asp His Tyr His Ala Pro Asn Ser Asp Leu Gly Pro Met His

275

280

285

Val His Glu Ser Lys Phe Arg Lys Trp Ser Ala Gly Tyr Ala Asp Phe

290

295

300

Asp Arg Gly Ala Tyr Val Ile Thr Phe Ile Pro Lys Ser Trp Asn Thr

305

310

315

320

Ala Pro Ala Lys Val Glu Gln Gly Trp Pro

325

330

<210> 44

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 44

ggcgatgggg aagagaaggg g

21

<210> 45

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 45

ggcggatcct cgcgtcgaga ggcgtggact ga

32

<210> 46

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 46

tacgaattcg agtcggtac c

21

<210> 47

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 47

cccccttctct tccccatgc ctgccgttgcc cacaggtgcg gcc

43

<210> 48

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 48

ggggtgaccc tgcgtcgga gtcgggggcc cgggagggcg cgctgg

46

<210> 49

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 49

aacggggaga acagcacggc cgccgg

26

<210> 50

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 50

ggcgaattct ccggcgggcc gtcaccggt

29

<210> 51

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 51

ggcaagctta aattcctgtg aattagctga

30

<210> 52

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 52

cggccgtgct gttctccccg ttgccgttg ccacaggtgc ggcc

44

<210> 53

<211> 20

<212> PRT

<213> Streptoverticillium mobaraense

<400> 53

Gln Ala Asp Ile Lys Asp Arg Ile Leu Lys Ile Pro Gly Met Lys Phe

1 5 10 15

Val Glu Glu Lys

20

<210> 54

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:probe for svPEP

<400> 54

aagatccccg ggatgaagtt cgtcgaggag aag 33

<210> 55

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 55

gaggcggcgt cgateaccgc ccc

23

<210> 56

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 56

gccaaagcttg aagcaccggc ggcggcaccc gg

32

<210> 57

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 57

ggggcgggtga tcgacgccgc ctctgccgtt gccacaggtg cggcca

46

<210> 58

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 58

gtgaccctgt cgtcggagtc ccggaacgac gggccggcgc

40

<210> 59

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 59

gtgaccctgt cgtcggagtc cgacgggccg gcgctcgaag

40

<210> 60

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 60

aatggcgcg gggaagagac gaagtcctac gccgaaacct

40

<210> 61

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 61

gagacgaagt cctacgccga aacctaccgc ctcacggcgg

40

<210> 62

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 62

gtctcttccc ccgcgccatt tgccgttgcc acaggtgcgg

40

<210> 63

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 63

tcggcgtagg acttcgtctc tgccgttgcc acagtgccg

40

<210> 64

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 64

gtgaccctgt cgtcggagtc cttggggccg aacgacgggc

40

<210> 65

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 65

gtgaccctgt cgtcggagtc gcgggggccg aacgacgggc

40

<210> 66

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 66

gtgaccctgt cgtcggagtc ctcggggccg gcgctcgaag

40

<210> 67

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 67

gtgaccctgt cgtcggagtc gcgcgggccg gcgctcgaag

40

<210> 68

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4)

<223> Xaa is Pro-pNA, pNA is p-nitroanilide

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:substrate for
svPEP

<400> 68

Phe Arg Ala Xaa

1

<210> 69

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:additional
sequence to native transglutaminase

<400> 69

Ser Ala Gly Pro Lys

1 5

<210> 70

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:additional
sequence to native transglutaminase

<400> 70

Ser Ala Gly Pro Arg

1 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06780

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ C12N15/63, C12P21/02, C12N9/10, C12N9/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ C12N15/63, C12P21/02, C12N9/10, C12N9/48

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP, 9-316095, A (Mitsubishi Chemical Corporation), 09 December, 1997 (09.12.97) (Family: none)	1-25
Y	JP, 10-108675, A (Ajinomoto Co., Inc.), 28 April, 1998 (28.04.98) (Family: none)	1-25
Y	EP, 198645, A1 (SANKYO CO), 22 October, 1986 (22.10.86) & JP, 6-253838, A & ES, 553735, A & AT, 58556, E & DE, 3675679, C & US, 4985361, A1 & KR, 9403653, B	1-25
Y	Kim, I-G. et al., "The deduced sequence of the novel protransglutaminase E (TGase3) of human and mouse" THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY (1993) Vol.268 No.17 p.12682-12690	2,8-11, 20-25
Y	Duran, R. et al., "Purification, characterisation, and gene clonig of transglutaminase from Streptovercillium cinnamoneum CBS 683.68", Biochimie (1998) Vol.80, No.4 pp.313-319	2,8-11, 20-25

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not
considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing
date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is
cited to establish the publication date of another citation or other
special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other
means

"P" document published prior to the international filing date but later
than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or
priority date and not in conflict with the application but cited to
understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered novel or cannot be considered to involve an inventive
step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered to involve an inventive step when the document is
combined with one or more other such documents, such
combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
18 December, 2000 (18.12.00)

Date of mailing of the international search report
26 December, 2000 (26.12.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06780

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP, 5-244947, A (Mercian Corporation), 24 September, 1993 (24.09.93) (Family: none)	26-30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06780

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The inventions as set forth in claims 1 to 25 pertain to processes for producing proteins by using coryneform bacteria, while the inventions as set forth in claims 26 to 30 pertain to proline-specific peptidases.

It cannot be recognized that the proline-specific peptidases according to the inventions as set forth in claims 26 to 30 are utilized exclusively for carrying out the inventions as set forth in claims 1 to 25. Such being the case, these two groups of inventions are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest



The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.



No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12N15/63, C12P21/02, C12N9/10, C12N9/48

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12N15/63, C12P21/02, C12N9/10, C12N9/48

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

Genbank/EMBL/DBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP, 9-316095, A (三菱化学株式会社) 9. 12月. 1997 (09. 12. 97) ファミリーなし	1-25
Y	JP, 10-108675, A (味の素株式会社) 28. 4月. 1998 (28. 04. 98) ファミリーなし	1-25
Y	EP, 198645, A1 (SANKYO CO) 22. 10月. 1986 (22. 10. 86) & JP, 6-253838, A & ES, 553735, A & AT, 58556, E & DE, 3675679, C & US, 4985361, A1 & KR, 9403653, B	1-25

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

18. 12. 00

国際調査報告の発送日

26.12.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

六笠 紀子

印

4B

9735

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Kim, I-G. et al. "The deduced sequence of the novel protransglutaminase E (TGase3) of human and mouse" THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY (1993) Vol. 268 No. 17 p. 12682-12690	2, 8-11, 20-25
Y	Duran, R. et al. "Purification, characterisation, and gene clonig of transglutaminase from <i>Streptoverticillium</i> <i>cinnamoneum</i> CBS 683.68" Biochimie (1998) Vol. 80 No. 4 p. 313-319	2, 8-11, 20-25
X	JP, 5-244947, A (メルシャン株式会社) 24.9月.1993 (24.09.93) ファミリーなし	26-30

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1乃至25に係る発明は、コリネ型細菌を用いてタンパク質を製造する方法についての発明であり、請求の範囲26乃至30に係る発明は、プロリン特異的ペプチダーゼに係る発明である。

ここで、請求の範囲26乃至30に係る発明であるプロリン特異的ペプチダーゼは、請求の範囲1乃至25に係る発明を実施するためにもっぱら利用されるものとは認められないので、これらの二つの発明群が単一の一般的発明概念を形成している連関している一群の発明であるとは認められない。

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。